SECRETARIA DE SALUD

NORMA Oficial Mexicana NOM-244-SSA1-2020, Para evaluar la eficiencia en reducción bacteriana en equipos y sustancias germicidas para tratamiento doméstico de agua. Requisitos sanitarios.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- SALUD.- Secretaría de Salud.

JOSÉ ALONSO NOVELO BAEZA, Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en lo dispuesto por los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4 de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3o., fracción XXIV, 13, apartado A, fracciones I y II, 17 bis, fracción III, 118, fracción II, 119, fracción II, 201, 210 y 214 de la Ley General de Salud; 38, fracción II, 40, fracciones I, II, XI y XII, 43 y 47, fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 23, 167, fracción XI, 197, 214, fracciones IV y V, 224, 225, 226 y 227 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; así como 3, fracciones I, incisos n), o) y s), V, VI y XIII y 10, fracciones IV y VIII del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, y

CONSIDERANDO

Que con fecha 22 de octubre de 2018, en cumplimiento del acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario y de lo previsto en el artículo 47, fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el Proyecto de la presente Norma, a efecto de que dentro de los sesenta días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentarán sus comentarios ante dicho Comité;

Que con fecha previa, fue publicada en el Diario Oficial de la Federación, la respuesta a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en los términos del artículo 47, fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, y

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, tengo a bien expedir y ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación de la

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-244-SSA1-2020, PARA EVALUAR LA EFICIENCIA EN REDUCCIÓN BACTERIANA EN EQUIPOS Y SUSTANCIAS GERMICIDAS PARA TRATAMIENTO DOMÉSTICO DE AGUA. REQUISITOS SANITARIOS

PREFACIO

En la elaboración de la presente Norma participaron:

SECRETARÍA DE SALUD

Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

Instituto Nacional de la Infraestructura Física Educativa

COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA

Subdirección General de Agua Potable, Drenaje y Saneamiento

INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA

Coordinación de Tratamiento y Calidad del Agua, Subcoordinación de Calidad del Agua.

SISTEMA DE AGUAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO

Judicatura de Investigación Tecnológica

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Ingeniería

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa-Ciencias Biológicas y de la Salud

LABORATORIOS ABC, QUÍMICA, INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS, S.A. DE C.V.

LABORATORIO FERMI, S.A. DE C.V.

CONFEDERACIÓN PATRONAL DE LA REPÚBLICA MEXICANA

ASOCIACIÓN DE DISTRIBUIDORES DE INSTRUMENTOS PARA USO CIENTÍFICO Y MATERIAL PARA LABORATORIO A.C.

LABORATORIO ANALÍTICO ESPECIALIZADO, S.A. DE C.V.

SERVICIOS ESPECIALIZADOS Y PRODUCTOS PARA TRATAMIENTOS DE AGUAS, S.A. DE C.V.

ANÁLISIS & RESEARCH LAB., S.A. DE C.V.

PRECISIÓN ANALÍTICA INTEGRAL, S.A. DE C.V.

LABORATORIOS DE ESPECIALIDADES INMUNOLÓGICAS, S.A. DE C.V.

ÍNDICE

0. Introducción.

1. Objetivo.

2. Campo de aplicación.

3. Referencias normativas.

4. Términos y definiciones.

5. Símbolos y términos abreviados.

6. Especificaciones.

7. Evaluación de la conformidad.

8. Concordancia con Normas Internacionales y Mexicanas.

9. Bibliografía.

10. Observancia de la Norma.

11. Vigencia.

12. Apéndices.

APÉNDICE A NORMATIVO

Método de prueba para evaluar la eficiencia en reducción bacteriana en equipos y sustancias germicidas para el tratamiento doméstico de agua.

APÉNDICE B INFORMATIVO

Determinación de organismos coliformes totales y E*scherichia coli.* Método del sustrato cromogénico.

APÉNDICE C INFORMATIVO

Determinación de bacterias coliformes totales y coliformes fecales. Método de filtración por membrana.

APÉNDICE D INFORMATIVO

Parámetros de riesgo y su evaluación para los materiales que se utilizan en la fabricación de equipos para tratamiento doméstico de agua.

APÉNDICE E INFORMATIVO

Criterios para determinar la estabilidad de las sustancias germicidas.

APÉNDICE F INFORMATIVO

Método para la determinación de colifagos.

APÉNDICE G INFORMATIVO

Montaje para la evaluación de equipos intradomiciliares o domésticos en la remoción de arsénico en agua para uso y consumo humano.

0. Introducción

El objetivo de los programas de abastecimiento de agua para uso y consumo humano, es asegurar que toda persona tenga acceso, disposición y saneamiento de agua para consumo personal y doméstico en forma suficiente, salubre, aceptable y asequible. En México, se continúa este esfuerzo; sin embargo, no se ha alcanzado la cobertura total, por lo que un cierto número de usuarios recurre a fuentes alternativas y métodos domésticos para subsanar deficiencias de la calidad del agua para uso o consumo humano.

Los métodos domésticos para la potabilización de agua de consumo humano, consisten en el uso de equipos para tratamiento y aplicación de sustancias germicidas orientados fundamentalmente al aspecto bacteriológico, considerado como de riesgo inmediato a la salud y en casos específicos, a la depuración de características físicas y/o químicas.

1. Objetivo

Esta Norma tiene por objeto, establecer las especificaciones sanitarias y características que deben cumplir los equipos y sustancias germicidas para el tratamiento doméstico de agua, a fin de obtener el Certificado de Efectividad Bacteriológica antes de su comercialización.

2. Campo de aplicación

Esta Norma es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que se dediquen al proceso de equipos y/o sustancias germicidas para el tratamiento doméstico de agua.

Los tratamientos de potabilización de agua para uso y consumo humano, de los sistemas de abastecimiento públicos y privados y plantas purificadoras de agua o cualquier persona física o moral que la distribuya en el territorio nacional, no son objeto de esta Norma, por lo que deberán cumplir los requisitos de la Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización; de la Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2015, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias y de la Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo, respectivamente.

3. Referencias normativas

Para la correcta aplicación de esta Norma, es necesario consultar las siguientes Normas Oficiales Mexicanas o las que las sustituyan:

3.1 Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de unidades de medida.

3.2 Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.

3.3 Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

3.4 Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

3.5 Norma Oficial Mexicana NOM-117-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.

3.6 Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

3.7 Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2015, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias.

3.8 Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

3.9 Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo.

4. Términos y definiciones

Para los efectos de esta Norma, se aplicarán los términos y definiciones siguientes:

4.1 Agua para uso y consumo humano, al agua que no contiene contaminantes objetables, ya sean químicos o agentes infecciosos y que no causa efectos nocivos para la salud, también se denomina como agua potable.

4.2 Bactericida, a la sustancia o medio, que elimina o destruye a las bacterias.

4.3 Bacteriostático, a la sustancia o medio que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias, sin eliminarlas o destruirlas.

4.4 Caducidad, a la fecha a partir de la cual la sustancia germicida pierde su poder activo.

4.5 Certificado de Efectividad Bacteriológica (CEB), a la constancia expedida por la autoridad sanitaria, a través de la COFEPRIS, a los equipos y sustancias germicidas para tratamiento doméstico de agua, mediante la cual se comprueba el cumplimiento de los requisitos sanitarios establecidos en la presente Norma, el cual especificará el nivel o grado de eficiencia en reducción bacteriana u otro parámetro manifestado y demostrado.

4.6 Coliformes totales, a las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, aerobios o anaerobios facultativos que se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, en un periodo de 48 h y con una temperatura de incubación de 308 ± 0.5 K (35 ± 0.5ºC). Incluyen a los coliformes fecales o termotolerantes, ya que requieren de una temperatura de 317 ± 0.5 K (44 ± 0.5°C). Son considerados los indicadores más regularmente usados para la medición de la calidad del agua.

4.7 Eficiencia en reducción bacteriana, a la capacidad que tienen los diversos equipos o sustancias utilizados para el tratamiento doméstico del agua en el lugar de consumo para retener, eliminar o inhibir las bacterias patógenas que afectan la calidad del agua.

4.8 Equipo para tratamiento doméstico de agua, al que se instala en un punto de uso domiciliario de agua (hogares, oficinas, bebederos escolares, edificios, entre otros lugares a los que acude la población), destinada al uso particular de las personas para beber o cocinar, con el propósito de retener, eliminar o inhibir los microorganismos presentes en ella.

4.9 Equipos para tratamiento doméstico de agua por origen de fabricación:

4.9.1 Fabricación nacional, a los productos cuya fabricación es realizada en el país, con componentes a su vez de origen nacional, o de origen extranjero.

4.9.2 Fabricación extranjera, importados con marca propia, a los productos cuya fabricación es realizada en el extranjero pero que en su comercialización se emplea una marca nacional con razón social en el país.

4.9.3 Fabricación extranjera, importados con marca propia extranjera, a los productos cuya fabricación es realizada en el extranjero, y su comercialización se realiza conservando la marca y son importados por un distribuidor con razón social en el país.

4.10 Germicida, al agente químico, que destruye microorganismos especialmente patógenos, no incluye la capacidad de destrucción de esporas.

4.11 Ingrediente activo, al componente presente en la formulación que confiere la acción biológica esperada a un desinfectante y otorga la eficacia al producto según su propósito.

4.12 Lote de tratamiento, a la cantidad de agua que puede contener el depósito del equipo que funciona por gravedad y que es tratada por éste, la cual deber estar especificada en el instructivo o manual de operación del fabricante en L.

4.13 Mesófilos aerobios, a las bacterias viables que determinan el grado de exposición del agua a la contaminación por microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 20 y 37°C.

4.14 Método de prueba, al procedimiento analítico utilizado en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la presente Norma.

4.15 Modelo, al equipo con los mismos componentes y características que proporcionan tratamiento al agua, bajo las mismas eficiencias, y que generen el mismo flujo de agua tratada, así como acción y/o efecto germicida.

4.16 No. de Lote de fabricación, combinación numérica o alfanumérica que identifica específicamente un lote de fabricación

4.17 Normal, N, medida de la concentración de una especie en disolución la cual está dada en equivalentes de soluto por litro de solución

4.18 Potencial de Hidrógeno, pH, es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución e indica la concentración de iones hidrógeno presentes en determinadas disoluciones. Puede variar entre 0 y 14, en donde 0 es lo más ácido, 7 es neutral y las disoluciones alcalinas tienen un pH superior a 7.

4.19 Proceso, al conjunto de actividades relativas a la obtención, elaboración, fabricación, preparación, conservación, mezclado, acondicionamiento, envasado, manipulación, transporte, distribución, almacenamiento y expendio, o suministro de equipos y sustancias germicidas.

4.20 Tercero Autorizado, a la persona autorizada por la Secretaría de Salud para emitir dictámenes respecto del cumplimiento de requisitos establecidos por la propia Secretaría o en las normas correspondientes o para realizar estudios, para efectos de trámites o autorizaciones sanitarias.

4.21 Vida útil, a la cantidad de agua que puede tratar un equipo, cumpliendo con la función para la cual ha sido creado, conservando su eficiencia en reducción bacteriana u otro parámetro manifestado.

4.22 Volumen vacío, al cálculo del volumen del agua contenido en las tuberías del banco de pruebas y en el equipo y se utiliza para calcular la cantidad de agua que se inoculará en la prueba de eficiencia en reducción bacteriana.

5. Símbolos y términos abreviados

Para los efectos de esta Norma se aplican los símbolos y términos abreviados siguientes:

5.1 %	Porcentaje.
5.2 >	Mayor que.
5.3 ±	Más/menos.
5.4 ≤	Menor o igual.
5.5 ≥	Mayor o igual.
5.6 °C	Grado Celsius.
5.7 APST	Agua de prueba inoculada sin tratar en UFC/ml o NMP/100 ml.
5.8 APT	Agua de prueba tratada en UFC/ml o NMP/100 ml.
5.9 As^{+5}	Arsénico pentavalente.
5.10 ATCC	Colección Americana de Tipo de Cultivos; es un material biológico de referencia certificado.
5.11 BaCl2	Cloruro de Bario.
5.12 CCAYAC	Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura.
5.13 CAS	Chemical Abstracts Service.
5.14 CENAM	Centro Nacional de Metrología.
5.15 cm^2	Centímetro cuadrado.
5.16 COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.
5.17 COT	Carbono Orgánico Total.
5.18 DNPC	Demasiado numerosas para contar.
5.19 EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético.
5.20 EMA	Entidad Mexicana de Acreditación.
5.21 ENDO LES	Medio de cultivo microbiológico, en el cual la mayoría de los organismos gram negativos crecen bien.
5.22 EPA	Environmental Protection Agency.
5.23 g	gramo.
5.24 h	horas.
5.25 H_2SO_4	Ácido Sulfúrico.
5.26 HCl	Acido Clorhidrico.
5.27 K	Kelvin.
5.28 KCl	Cloruro de potasio.
5.29 KH_2PO_4	Fosfato dihidrogenado de potasio.
5.30 L	Litro.

5.31 LED	Del acrónimo inglés LED, light-emitting diode: 'diodo emisor de luz.
5.32 M	Molar.
5.33 M-ENDO	Medio de cultivo para el desarrollo y para el recuento de Coliformes totales en agua.
5.34 mg	Miligramos.
5.35 mJ	milijulio.
5.36 ml	Mililitro.
5.37 mm	milímetro.
5.38 MS-2	Colifago de la familia LEVIVIRIDAE.
5.39 mW	milivatio.
5.40 NaCl	Cloruro de sodio.
5.41 Na_2HPO_4	Fosfato Monohidrogenado de sodio.
5.42 $Na_2HAsO_47H_2O$	Arsenato de sodio heptahidratado.
5.43 NaOH	Hidróxido de sodio.
5.44 nm	Nanómetro.
5.45 No.	Número.
5.46 NMP	Número más probable.
5.47 NTU	Unidades Nefelométricas de Turbiedad.
5.48 OMS	Organización Mundial de la Salud.
5.49 ONPG	Orto-nitrofenil-ß-galactósido es un sustrato colorimétrico y espectrofotométrico para la detección de la actividad ß-galactosidasa.
5.50 PBS	Solución Salina Amortiguada por Fosfatos.
5.51 psi	Unidad de presión en el sistema anglosajón de unidades, libra-fuerza por pulgada cuadrada.
5.52 PVC	Policloruro de vinilo.
5.53 RBCT	Reducción Bacteriana de Coliformes Totales.
5.54 RBMA	Reducción Bacteriana de Mesófilos Aerobios.
5.55 SDT	Sólidos disueltos totales.
5.56 TSA	Agar Tripticasa soya.
5.57 TSB	Soya tripticaseína (Tryptic Soy Broth, TSB).
5.58 UFC	Unidades Formadoras de Colonias.
5.59 UFP/ml	Unidades Formadoras de Placa por ml.
5.60 UV	Ultra violeta.
5.61 xg	Unidad de fuerza que expresa en número de veces que la fuerza centrífuga supera a la fuerza de gravedad.

6. Especificaciones

Las personas físicas o morales que se dediquen al proceso de equipos y/o sustancias germicidas para tratamiento doméstico de agua, deberán de contar con el CEB expedido por la autoridad sanitaria (COFEPRIS), por cada modelo de equipo y/o por cada tipo de presentación de sustancia germicida antes de su comercialización, el cual tendrá una vigencia de 1 año.

6.1 Mecanismo de Certificación: Tomando en cuenta el origen del equipo y/o sustancia germicida, aplicará el siguiente mecanismo:

6.1.1 Fabricación nacional o importado con marca propia: Únicamente podrá realizar los trámites de certificación, el representante legal del fabricante o poseedor de la marca, cumpliendo con todos los requisitos respecto a pruebas sanitarias, manuales operativos y trazabilidad, así como de personalidad jurídica que se le soliciten. En este caso el certificado saldrá a nombre del fabricante o poseedor de la marca, con su respectiva responsabilidad sobre el producto.

6.1.2 Importado por distribuidor con marca extranjera: Lo podrá realizar un distribuidor o asociación de distribuidores que mediante una carta de representación del fabricante en papel membretado, en español o en el idioma del país de origen con su respectiva traducción por perito traductor, en la cual el fabricante le otorgue derechos de comercialización del producto con valor de representante o franquicia.

Deberá cumplir con todos los requisitos establecidos en el inciso 6.1.1 de esta Norma.

En este caso, el certificado se emitirá a nombre del distribuidor o asociación de distribuidores y recaerá en su totalidad la responsabilidad sobre él.

6.1.3 Distribuidores adicionales: Aquéllos que deseen importar un producto que ya cuente con el CEB obtenido de otra persona física o moral, podrán obtener copia validada del certificado, pagando los derechos de certificación y registrando los números de lotes a comercializar, además deberán de presentar la autorización escrita del representante legal del poseedor del CEB original. Una vez terminada la vigencia del CEB o, si quien tiene el CEB original no desea autorizar al distribuidor o asociación de distribuidores durante la vigencia del mismo, entonces si sería posible que otro distribuidor realice el trámite cumpliendo con los requisitos establecidos en los incisos 6.1.1 y 6.1.2 de esta Norma.

En este caso, los gastos de pruebas o administrativos realizados anteriormente por el distribuidor o grupo de distribuidores que obtuvieron el CEB originalmente, serán absorbidos por los mismos sin perjuicio para importadores posteriores.

6.2 Eficiencia en reducción bacteriana por cada modelo de equipo para tratamiento doméstico de agua.

6.2.1 Un laboratorio Tercero Autorizado por COFEPRIS deberá evaluar la eficiencia en reducción bacteriana de conformidad con el Apéndice A Normativo de esta Norma, con las aguas de prueba inoculadas 1 y 2 (Tablas A.3 y A.4 de esta Norma) en intervalos de 0, 50, 75 y 100% de la vida útil del equipo y los adicionales que requiera la persona física o moral, siguiendo las recomendaciones del fabricante y considerando el mantenimiento del mismo cuando aplique, reportados en L de agua tratada.

6.3 Eficiencia en reducción bacteriana para cada tipo de presentación de sustancia germicida.

El interesado deberá declarar la caducidad por cada presentación de la sustancia germicida en función de los estudios de estabilidad reportados a temperatura ambiente, si no cuenta con ellos podrá presentar estudios a temperatura acelerada; en el caso de la renovación del CEB, deberá de presentar el estudio de estabilidad a temperatura ambiente, esto permitirá conocer la caducidad real de la sustancia.

Un laboratorio Tercero Autorizado por COFEPRIS deberá evaluar la eficiencia en reducción bacteriana de conformidad con el Apéndice A Normativo de esta Norma, al inicio de la caducidad declarada con base en la dosis, volumen de agua a tratar y tiempo de contacto de la sustancia ~~g~~ermicida y al final con base en la fecha de caducidad real determinada en los estudios de estabilidad a temperatura ambiente, dosis, volumen de agua a tratar y tiempo de contacto de la sustancia germicida.

El laboratorio que efectúe los estudios de estabilidad podrá ser un Tercero Autorizado por COFEPRIS, o realizados por un laboratorio o institución pública o privada reconocida a nivel nacional o internacional mediante un sistema de gestión de calidad ISO 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (International Organization for Standardization) o Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

Para el cumplimiento respecto a este inciso se podrá consultar el Apéndice E Informativo de esta Norma.

6.4 Eliminación de otros parámetros por cada modelo de equipo para tratamiento doméstico de agua y/o sustancia germicida.

Cuando el interesado indique que el equipo para tratamiento doméstico de agua o sustancia germicida, remueve o elimina otro(s) parámetro(s) microbiológico(s) y/o físico-químicos, diferentes a los que se determinan en la prueba de eficiencia en reducción bacteriana en equipos y sustancias germicidas, indicados en el Apéndice A Normativo Método de prueba para evaluar la eficiencia en reducción bacteriana en equipos y sustancias germicidas para tratamiento doméstico de agua, debe presentar resultados de la eficiencia del equipo o sustancia germicida en la reducción o eliminación de cada uno de los que manifieste, al 0, 50, 75 y 100% de la Vida útil, reportados en L de agua tratada del equipo o tratándose de la sustancia germicida de acuerdo a la fecha de caducidad y a lo señalado en el inciso 6.3 de esta Norma.

Si el solicitante demuestra la eficiencia del equipo o sustancia germicida en estos parámetros adicionales, podrá incluir esta información en el manual de operación y mantenimiento o en la etiqueta. El CEB reflejará estos parámetros cuando así lo demuestren.

Los resultados deberán ser emitidos por un Tercero Autorizado por la COFEPRIS, en caso de que el(os) parámetro(s) a analizar no se encuentre(n) dentro del listado de terceros autorizados, podrá presentar estudios practicados al equipo o sustancia germicida por un laboratorio o institución pública o privada reconocida a nivel nacional o internacional mediante un sistema de gestión de calidad ISO 17025 (International Organization for Standardization; https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-2:v1:es) o en la Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración (http://integra.cimav.edu.mx/intranet/data/files/calidad/documentos/externos/NMX-EC-17025-IMNC-2006.pdf), bajo un método normalizado y validado, y buenas prácticas de laboratorio para microbiología de la OMS. Cumpliendo con los límites máximos permisibles, dispuestos en la Norma Oficial Mexicana citada en el inciso **3.6** del Capítulo de Referencias normativas de esta Norma o las recomendaciones de la OMS (Guías para la calidad del agua potable http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_fulll_lowsres.pdf?ua=1.

Para el cumplimiento respecto a virus y/o Arsénico de este inciso se podrán utilizar los métodos establecidos en los Apéndices F y G Informativos de esta Norma.

Antes de que se efectúen las pruebas deberá presentar ante la COFEPRIS, un protocolo de estudio elaborado por el laboratorio seleccionado, el cual deberá incluir:

6.4.1 La metodología (descripción del proceso de evaluación de los equipos para tratamiento doméstico de agua), incluyendo un diagrama de flujo;

6.4.2 Cantidades de remoción por cada parámetro manifestado en su escrito, a las cuales se someterán los equipos para demostrar su eficiencia;

6.4.3 Etapas de L de agua tratada por los equipos a las que se realizarán las pruebas de eficiencia en reducción de los parámetros en comento (0, 50, 75 y 100% de la vida útil y los adicionales que requiera la persona física o moral);

6.4.4 Infraestructura a utilizar en el proceso de evaluación de los equipos para tratamiento doméstico de agua, o sustancias germicidas con evidencia fotográfica del banco de pruebas;

6.4.5 Métodos analíticos;

6.4.6 Cronograma de actividades, y

6.4.7 Reporte final incluyendo límites de detección y cuantificación, soporte técnico (como mínimo cromatogramas y curvas de calibración cuando aplique).

6.5 Criterio para obtención del CEB y otros parámetros.

El CEB estará avalado por los informes de resultados de un Tercero Autorizado por COFEPRIS que efectúe el estudio de la vida útil del equipo para tratamiento doméstico de agua y sustancias germicidas, utilizando los métodos de prueba indicados en el inciso A.10.6 del Apéndice A Normativo de esta Norma.

Los equipos deberán ser sometidos a prueba con el agua de prueba 1 y agua de prueba 2 (Tablas A.3 y A.4 de esta Norma), demostrando una eficiencia en reducción bacteriana del 95% de Mesófilos aerobios y 99.99% de Coliformes totales.

La obtención del CEB se otorgará cuando:

6.5.1 Los dos equipos cubran el 100% de la vida útil manifestada por el fabricante.

Los dos equipos cubran al menos el 75% de la vida útil que manifieste el fabricante, el CEB se emitirá indicando su vida útil demostrada.

6.5.2 Cuando uno de los dos equipos no cubra al menos el 75% de la vida útil manifestada por el fabricante, no se otorgará el CEB, en este caso se deberá realizar nuevamente la prueba manifestando una vida útil menor.

6.5.3 Las sustancias germicidas sometidas a prueba deben demostrar su efectividad, acorde a las dosificaciones establecidas en el manual del fabricante.

6.6 Criterios para obtener un CEB incluyendo otros parámetros

Los equipos sometidos a prueba, deberán de demostrar que eliminan o reducen otros parámetros microbiológicos, físicos, químicos manifestados, bajo los criterios del inciso 6.4 de esta Norma.

6.7 Materiales de fabricación del equipo para tratamiento doméstico de agua.

Referente a los materiales de fabricación, deberá de presentar un listado de los componentes que estén en contacto con el agua, con evidencia documental o informe de resultados de laboratorio, emitido por un organismo, institución o laboratorio público o privado reconocido a nivel nacional o internacional que indique que los materiales que se utilizan para la fabricación del equipo en su totalidad o de cada uno de los componentes que lo conforman, no liberan sustancias que puedan causar daño a la salud de los usuarios. El laboratorio que realice el estudio deberá de cumplir lo establecido en el inciso 6.3 de esta Norma.

Para el cumplimiento de este inciso se aceptará el informe de resultados emitido por el método establecido en el Apéndice D Informativo de esta Norma.

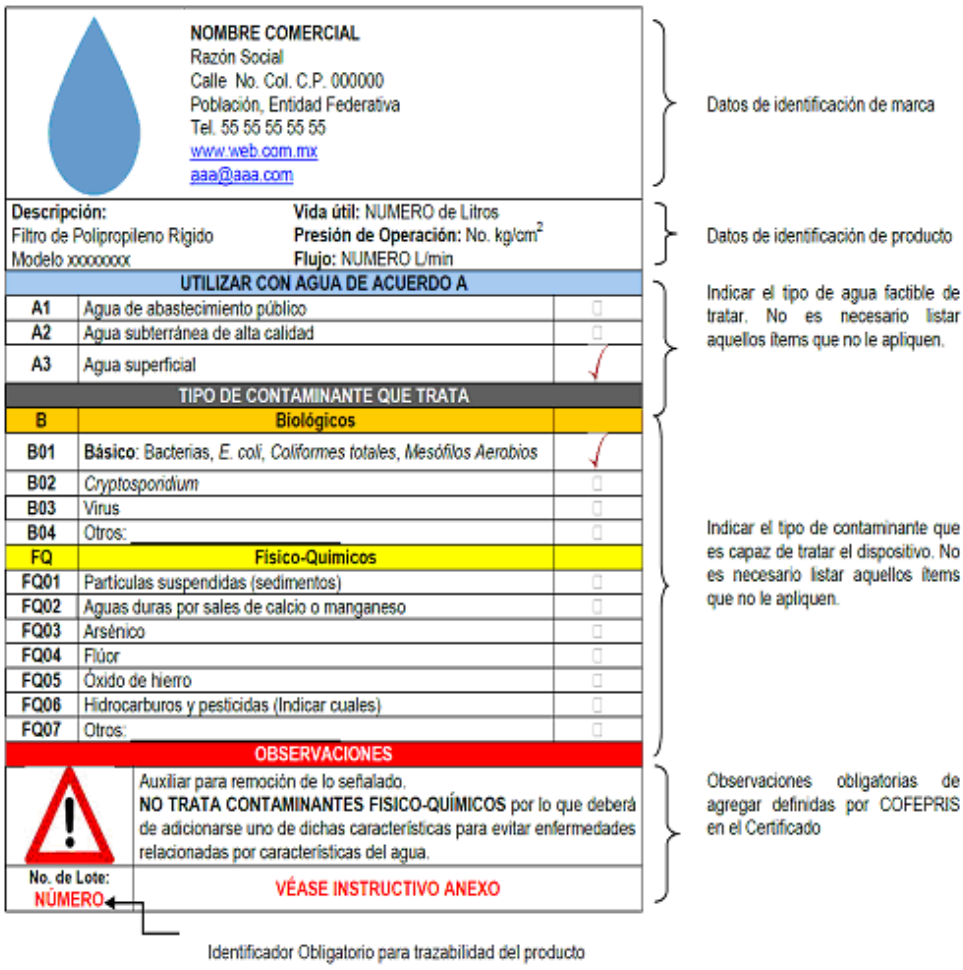
6.8 Hoja de datos de seguridad de la sustancia germicida.

Deberá de presentar la hoja de datos de seguridad emitidos por el fabricante conforme a las disposiciones indicadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2015, Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo o la que la sustituya.

6.9 Etiqueta del equipo para tratamiento doméstico de agua.

Por cada modelo de equipo para tratamiento doméstico de agua se deberá ostentar en su etiqueta: nombre y modelo (debe ser el mismo que se indica en el CEB, vida útil en L de agua tratada y tiempo aproximado de vida útil en condiciones de uso, presión de operación, flujo máximo (L/minuto) al que se puede operar el equipo, utilizar con agua de abastecimiento público, subterránea de alta calidad o superficial, tipo de contaminante que trata por colores, observaciones, No. de Lote y la leyenda “véase instructivo anexo”, nombre y/o razón social del fabricante, distribuidor y/o importador, así como el domicilio del mismo). La etiqueta sólo debe contener los parámetros aprobados por la COFEPRIS (Ver Esquema 1 de esta Norma).

Esquema 1. Ejemplo de etiqueta del equipo.



6.10 Instructivo o manual de operación del equipo para tratamiento doméstico de agua.

El instructivo o manual de operación del equipo para tratamiento doméstico de agua, debe ser específico para cada modelo de equipo, indicando cuando menos la información en español siguiente:

6.10.1 Finalidad de uso. Deberá de indicar los microorganismos, contaminantes físicos y/o químicos que el equipo elimina o retiene;

6.10.2 Diagrama hidráulico de flujo. Debe incluir, los elementos de los que está constituido el equipo, y los componentes que proporcionan el tratamiento al agua, donde se debe describir de manera secuencial cómo opera el equipo para efectuar la desinfección del agua, la manera en que el agua fluye a través de los componentes del equipo y el tratamiento que proporcionan éstos al agua;

6.10.3 Las características de la calidad del agua de prueba (agua de abastecimiento público, subterránea de alta calidad o superficial), con la que se evaluó la efectividad bacteriológica del equipo, al 0, 50, 75 y 100% de la vida útil y las adicionales que se practicaron al equipo que la persona física o moral solicitó;

6.10.4 El flujo de agua tratada en L por minuto que el equipo puede procesar para su potabilización, y para el cual fue diseñado;

6.10.5 La presión máxima del agua a la que el equipo debe operar;

6.10.6 El procedimiento de instalación, uso y mantenimiento o cambio de piezas del equipo, incluyendo el de los componentes que proporcionan el tratamiento al agua, debiendo indicar el domicilio y teléfonos donde el usuario pueda contactar al fabricante.

6.10.7 Con base en los resultados de eficiencia en reducción bacteriológica, la vida útil del equipo referida a volumen de agua tratada (en L) así como de los elementos que proporcionan el tratamiento al agua.

6.11 Etiqueta de la sustancia germicida para tratamiento doméstico de agua.

La etiqueta de la sustancia germicida, debe usar un lenguaje claro y sencillo, la información que por el tamaño del envase no pueda formar parte del etiquetado, deberá presentarse en un folleto o instructivo que acompañe a cada envase. En estos casos se imprimirá la leyenda “CONSULTE EL INSTRUCTIVO ANEXO”. La etiqueta de la sustancia germicida debe ostentar la información en idioma español siguiente:

6.11.1 Nombre comercial del producto;

6.11.2 Nombre común del producto;

6.11.3 Presentación;

6.11.4 Composición porcentual del ingrediente activo, inerte y/o diluyentes;

6.11.5 Contenido Neto;

6.11.6 Finalidad de uso. Deberá de indicar los microorganismos que inhibe y/o elimina;

6.11.7 Instrucciones de uso. Indicar la cantidad de producto a aplicar por L de agua a desinfectar, dependiendo de su origen (agua de abastecimiento público, subterránea de alta calidad o superficial con la que se evaluó la efectividad bacteriológica de la sustancia. Tiempo de contacto de la sustancia en la desinfección del agua;

6.11.8 Condiciones de almacenamiento;

6.11.9 Precauciones y advertencias de uso;

6.11.10 Caducidad;

6.11.11 No. de Lote de fabricación y

6.11.12 Nombre, dirección y teléfono del importador, distribuidor y/o comercializador. Si el producto es fabricado o formulado en territorio nacional debe Imprimirse la leyenda “HECHO EN MÉXICO” En casos de productos de importación “HECHO EN…” (País de origen), en caso de productos de importación a granel que sean envasados en México, debe imprimirse la leyenda “ENVASADO EN MÉXICO”.

6.12 Las personas físicas o morales referidas en el inicio del Capítulo 6 de esta Norma, deben tener a disposición de la autoridad sanitaria para cuando ésta la requiera, la siguiente información:

6.12.1 Ingredientes activos, formulación de materias primas, componentes de las sustancias germicidas y partes componentes del equipo, y

6.12.2 País de origen de los ingredientes activos de la sustancia germicida o, en su caso, indicar si es en su totalidad de producción nacional o de importación.

7. Evaluación de la conformidad

La evaluación de la conformidad podrá ser solicitada a instancia de parte, por el responsable sanitario, el representante legal o la persona que tenga las facultades para ello, ante la autoridad competente o las personas acreditadas o autorizadas para tales efectos.

8. Concordancia con Normas Internacionales y mexicanas

Esta Norma Oficial Mexicana no coincide con ninguna Norma Internacional, ni Mexicana.

9. Bibliografía

9.1 Organización Mundial de la Salud. Guías para la calidad del agua potable, 2011 (http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es/).

9.2 Bacteriological Analytical Manual C. 8th. Edition. Rev. A. Food and Drug Administration. Division of Microbiology. 1999. EUA.

9.3 EPA Guidance Manual Turbidity Provisions. Chapter 10. Turbidity through the Treatment Processes-April 1999.

9.4 Mahmoud & Saffa (2002). Water desalination technologies utilizing conventional and renewable energy sources. Institute of Sustainable Energy Technology, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, UK.

9.5 Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1995. Washington D.C. EUA.

9.6 NMX-BB-040-SCFI-1999. Métodos generales de análisis-determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas https://www.yumpu.com/es/document/view/14197834/nmx-bb-040-scfi-1999-metodos-generales-de-analisis-.

9.7 Organización Mundial de la Salud. Evaluación de métodos para el tratamiento doméstico del agua: metas sanitarias y especificaciones de Eficiencia microbiológica, 2012. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79186/1/9789243548227_spa.pdf?ua=1

9.8 Shatat et al (2012). State of art Water Desalination Technologies using conventional and sustainable energy sources.

9.9 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. 20th Ed. Washington D.C. 2001. EUA.

9.10 The Desalting and Water Treatment Membrane Manual: A Guide to Membranes for Municipal Water Treatment, Water Treatment Technology Program, Report No. 1, September 1993, published by the United States Department of the Interior, Bureau of Reclamation, Denver Office, Research and Laboratory Services Division, Applied Sciences Branch.

9.11 United States environmental protection agency. Guide standard and protocol for testing microbiological water purifiers, 1987.

9.12 WHO International Scheme to Evaluate Household Water Treatment. Harmonized Testing Protocol: Technology Non-Specific, 2014.Geneva, Switzerland.

10. Observancia de la Norma

La vigilancia en el cumplimiento de esta Norma corresponde a la Secretaría de Salud y a los gobiernos de las entidades federativas, en sus respectivos ámbitos de competencia.

11. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor a los 180 días naturales posteriores a su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

TRANSITORIOS

PRIMERO. Esta Norma deja sin efectos a la Norma Oficial Mexicana NOM-244-SSA1-2008, Equipos y sustancias germicidas para tratamiento doméstico de agua. Requisitos sanitarios, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 4 de septiembre de 2009.

SEGUNDO. Los equipos o sustancias germicidas que cuenten con un Dictamen de Efectividad Bacteriológica, tendrán un plazo de seis meses, contados a partir de la fecha de entrada en vigor de esta Norma, para solicitar el CEB con el fin de agotar las existencias de los productos con etiquetas o envases litografiados.

Ciudad de México, a 3 de noviembre de 2020.- El Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, **José Alonso Novelo Baeza**.- Rúbrica.

12. Apéndices

APÉNDICE A NORMATIVO

Método de prueba para evaluar la eficiencia en reducción bacteriana en equipos y sustancias germicidas para tratamiento doméstico de agua.

A.1 Introducción.

El agua que diariamente se suministra a la población, es empleada ya sea para beber; preparar comida; asearse, bañarse y satisfacer todas las necesidades higiénicas. El agua para uso y consumo humano debe ser salubre, aceptable y asequible.

Para efectos de la protección contra riesgos sanitarios referidos al consumidor en todos sus niveles sociales, las fuentes naturales del agua deben mantenerse eficientemente vigiladas y protegidas. El líquido captado debe ser sometido a un tratamiento previo, cumpliendo con las disposiciones aplicables al ser disponible para el usuario final.

Sin embargo, en ocasiones se puede poner en riesgo la calidad del agua potabilizada o de procedencia natural y es necesario ≪el tratamiento del agua en el lugar de consumo≫ (en inglés, *point-ofuse water treatment*), principalmente para beber y preparar alimentos, lo anterior se logra mediante la utilización de equipos para tratamiento doméstico de agua o sustancias germicidas que aseguran la eliminación de microorganismos patógenos o la eliminación de contaminantes químicos tóxicos.

En el caso de equipos la eficiencia en reducción bacteriana depende de factores como el proceso de tratamiento utilizado, característica del agua a tratar, el modo de operación; y en caso de sustancias, de la composición química y cinética del ingrediente activo del germicida. Dicha capacidad debe ser sometida a prueba a fin de garantizar la salud de la población que hace uso de estos productos para obtener agua para uso y consumo humano.

A.2 Objetivo.

Evaluar la eficiencia en reducción bacteriana en equipos y en sustancias germicidas, para comprobar que cumplen con las propiedades antimicrobianas para los cuales fueron creados y que le son atribuidas por el fabricante.

A.3 Fundamento.

El Método de prueba para determinar la eficiencia en reducción bacteriana de equipos para tratamiento doméstico de agua y/o sustancias germicidas descrito en el presente Apéndice, consiste en evaluar su desempeño para retener, destruir o inactivar bacterias.

La evaluación de los equipos para tratamiento doméstico de agua, se lleva a cabo haciendo pasar agua de prueba 1 y agua de prueba 2 (Tablas A.3 y A.4 de esta Norma), a través de éstos, así como agua inoculada con bacterias vivas (cepa evaluada), en diferentes etapas de la vida útil.

Para evaluar las sustancias germicidas, se probarán agregándolas al agua de prueba 1 y agua de prueba 2 (Tablas A.3 y A.4, de esta Norma), considerando su caducidad conforme a los estudios de estabilidad.

A.4 Consideraciones generales.

A.4.1 El laboratorio de prueba que realice los análisis deberá ser un Tercero Autorizado por la COFEPRIS.

A.4.2 Para obtener resultados significativos, es de suma importancia seguir fielmente y controlar cuidadosamente las condiciones en las que se lleva a cabo este método.

A.4.3 Todo el material que esté en contacto con las muestras deberá estar estéril utilizando un ciclo de esterilización previamente validado por la CCAYAC.

A.4.4 Equipos y Reactivos.

A.4.4.1 Todos los equipos los deberá tener incluidos el laboratorio de prueba que realice los análisis en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo. La calibración además deberá ser trazable a un patrón nacional establecido conforme al CENAM. Los reactivos deberán ser de grado analítico.

A.4.4.1.1 Potenciómetro. Deberán tener una precisión de verificación mínima de ± 0.1 unidades de pH a 20° C – 25° C, deben verificarse el día de uso con soluciones amortiguadoras trazables al CENAM u otro patrón nacional emitido por un Instituto Nacional de Metrología incorporado al Arreglo de Reconocimiento Mutuo del Comité Internacional de Pesas y Medidas.

A.4.4.1.2 Balanza analítica. Deberán ser verificadas el día de uso utilizando un marco de pesas calibrado o verificado.

A.4.4.1.3 Incubadora de aire con circulación mecánica, para operar a una temperatura de 35 ± 2° C. Las incubadoras y baños de agua, deberán demostrar mediante el muestreo en diferentes puntos de la cámara y durante un tiempo determinado, que asegure las condiciones de incubación de la prueba que pueden trabajar a los intervalos de temperatura indicados en los métodos.

A.4.4.1.4 Baño de agua con circulación mecánica y mezcla de agua, para operar a una temperatura de 44.5 ± 0.2° C.

A.4.4.1.5 Autoclave con termómetro y manómetro, capaz de alcanzar temperatura de esterilización de 121 ± 2° C, probado con termómetro de máximas. Las autoclaves y hornos que se utilicen para la esterilización de material y medios de cultivo, debe contar con instrumentos de medición calibrados. Cada ciclo de esterilización debe estar controlado paramétricamente (temperatura y presión) y con indicadores biológicos o contar con un programa de monitoreo con indicadores biológicos, considerando la frecuencia de uso y las condiciones de mantenimiento. El laboratorio debe contar con ciclos de esterilización que garanticen la esterilidad de los materiales sometidos a esterilización sin afectación de sus características, con el propósito de demostrar la distribución y la penetración del calor.

A.4.4.1.6 Horno para esterilizar a 160-180° C.

A.4.4.1.7 Termómetros. Cuando se indique el uso de un termómetro, éste deberá estar dentro de un programa de calibración y/o verificación vigente por parte del laboratorio que practique la prueba, esta última contra un termómetro patrón. Los equipos de incubación deberán contar con termómetros calibrados con división mínima de la mitad de la variación permitida al equipo por el método, por ejemplo cuando se indique una variación de ± 1° C el termómetro deberá tener una división mínima de 0.5° C.

A.4.4.1.8 Espectrofotómetro con escala de Transmitancia o Nefelómetro de Mc Farland.

A.4.4.1.9 Pipetas serológicas estériles de 1 y 10 ml de capacidad, con graduación de una décima de su volumen total. (Se recomienda contar complementariamente con pipetas de 2, 5 y 11 ml de capacidad).

A.4.4.1.10 Tubos de cultivo de 22 x 175 mm, 20 x 200 mm, 16 x 160 mm y 10 x 100 mm, con tapa metálica o de rosca.

A.4.4.1.11 Botellas de Roux.

A.4.4.1.12 Asa de platino o nicromel.

A.4.4.1.13 Contador manual.

A.4.4.1.14 Contador de colonias con fondo oscuro.

A.4.4.1.15 Cajas de Petri estériles de 100 X 15 mm.

A.4.4.1.16 Mecheros Fisher o Bunsen.

A.4.4.1.17 Solución salina estéril al 0.85 % (8.5 g de cloruro de sodio grado analítico en 1000 ml de agua destilada o desionizada).

A.4.5. Medios de Cultivo.

A.4.5.1 Todos los medios de cultivo deberán usarse hasta haber aprobado el control de calidad adecuado para su uso, con excepción de los medios de cultivo que tengan como restricción el tiempo de uso, en esos casos los resultados del análisis no podrán ser emitidos hasta haber completado su control de calidad.

A.4.5.2 Pueden utilizarse medios de cultivo preparados en el laboratorio por ingrediente, medio de cultivos preparados en polvo o listo para su uso, siempre que éstos cumplan con la formulación descrita en el método.

A.4.5.3 Debe realizarse control de calidad de los medios de cultivo, acorde a un método científico.

A.4.5.4 Los reactivos a emplear en el método objeto, de esta Norma, deben ser grado analítico.

A.4.6 Cepas de referencia.

A.4.6.1 Debido a la variabilidad inherente de los materiales biológicos es necesario demostrar que las cepas control utilizadas proceden de una colección de microorganismos que asegure la identidad y las características de los microorganismos para su uso como patrones biológicos. Las cepas control utilizadas deberán demostrar trazabilidad a una colección de microorganismos reconocida y deberán demostrar la pureza y viabilidad de las mismas.

A.4.7 Agar nutritivo A.

Extracto de carne 3 g

Peptona 5 g

Agar libre de sales 15 g

Agua destilada o desionizada 1000,0 ml

Poner en ebullición durante tres minutos el extracto de carne y la peptona (Bacto o equivalente); agregar el agar y calentar, agitando continuamente hasta disolver.

Distribuir en tubos de 10 x 100 mm y esterilizar 20 minutos a 121° C (el medio no debe sufrir sobrecalentamiento, lo que se evita por un precalentamiento del autoclave).

Utilizar este medio para efectuar los subcultivos.

A.4.8 Agar nutritivo B.

Preparar del mismo modo que el Agar nutritivo A, descrito en el inciso A.4.7 de este Apéndice, pero agregando 30 g de agar libre de sales en lugar de los 15 g especificados en dicho inciso.

Distribuir 20 ml del medio en cada botella de Roux o tubos de 22 x 175 mm.

Utilizar este medio para preparar el cultivo de referencia.

A.4.9 Solución neutralizante concentrada.

Mezclar 40 g de azolectina, con 280 ml de polisorbato 80 y 1.25 ml de solución amortiguadora de fosfatos, diluir con agua hasta obtener un volumen final de un 1 L, ajustar el pH a 7.2 con solución volumétrica de NaOH o HCl, distribuir en porciones de 100 ml. Esterilizar en autoclave a 121° C por 20 minutos.

A.4.10 Solución neutralizante diluida.

Mezclar 100 ml de la solución neutralizante concentrada con 25 ml de la solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M, adicionar 1675 ml de agua, mezclar y distribuir en porciones de 9 ml en tubos con rosca. Esterilizar en autoclave a 121°C por 20 minutos.

A.4.11 Caldo neutralizante.

Mezclar los siguientes componentes: Triptona 5 g, extracto de levadura 2.5 g, dextrosa 10 g, tioglicolato de sodio 1 g, tiosulfato de sodio 6 g, bisulfito de sodio 2.5 g, polisorbato 805 g, lecitina de soya 7 g, púrpura de bromocresol 0.02 g y agua destilada 1 L, calentar a disolución, ajustar pH a 7.2 distribuir y esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos.

El caldo neutralizante se deberá utilizar para realizar las diluciones como lo indica el inciso A.10.6 de esta Norma.

A.5 Microorganismo de prueba.

Cepa de *Escherichia coli* ATCC 11229

A.6 Preparación del cultivo de referencia.

Tomar una asada de la cepa de *Escherichia coli* y sembrar en una botella de Roux con Agar nutritivo B; incubar de 20 a 24 h a una temperatura de 35 ± 2° C, hacer por lo menos tres siembras.

A.7 Preparación del subcultivo.

Tomar una asada de cada cultivo de referencia y resembrar en tubos independientes con Agar nutritivo A; incubar 20-24 h a una temperatura de 35 ± 2° C.

A.8 Preparación de la suspensión de *Escherichia coli.*

A.8.1 A partir del subcultivo en tubo ya desarrollado, adicionar 5 ml de solución salina al 0.85 % estéril y agitar suavemente en forma manual, rotando verticalmente el tubo entre las dos manos, para obtener una suspensión bacteriana, la cual se transfiere a un tubo estéril.

A.8.2 Diluir la suspensión bacteriana con solución salina estéril al 0.85 %, a la Transmitancia o Turbiedad elegida, de acuerdo con la concentración de bacterias establecida en los incisos A.8.2.1 y A.8.2.2 de este Apéndice.

A.8.2.1 Método espectrofotométrico.

Determinar la concentración de bacterias en UFC/ml, utilizando la Tabla A.1 de este Apéndice.

Tabla A.1

370 nm	420 nm	490 nm	530 nm	550 nm	580 nm	650 nm	Longitud de onda en: nm
% Transmitancia con filtros							UFC/ml x 10^9
7,0	4,0	6,0	6,0	6,0	7,0	8,0	13,0
8,0	5,0	7,0	7,0	7,0	8,0	9,0	11,5
9,0	6,0	8,0	8,0	8,0	9,0	10,0	10,2
10,0	7,0	9,0	9,0	9,0	10,0	11,0	8,6
11,0	8,0	10,0	10,0	10,0	12,0	13,0	7,7
13,0	9,0	12,0	12,0	12,0	13,0	15,0	6,7

Nota. La calibración del aparato debe realizarse con un blanco de solución salina estéril.

A.8.2.2 Método nefelométrico.

Determinar la concentración de bacterias en UFC/ml, utilizando la Tabla A.2 de este Apéndice.

Tabla A.2

Solución de $BaCl_2$ al 10 %	Solución de H_2SO_4 al 1,0% ml	Escala de Mc Farland	UFC millones/ml
0,1	9,9	4,0	300
0,2	9,8	3,7	600
0,3	9,7	3,5	900
0,4	9,6	3,4	1200
0,5	9,5	3,3	1500
0,6	9,4	3,2	1800
0,7	9,3	3,15	2100
0,8	9,2	3,10	2400
0,9	9,1	3,04	2700
1,0	9,0	3,00	3000

Diluir la suspensión bacteriana con solución salina estéril al 0.85 %, a la Transmitancia o Turbiedad elegida, de acuerdo con la concentración de bacterias de 5,000 a 10,000 UFC/ml para Mesófilos aerobios y ≥ a 1,600 NMP/100 ml para coliformes totales.

A.9. Determinación de la cuenta viable.

A un matraz Erlenmeyer que contenga 99 ml de solución amortiguadora de fosfatos diluida estéril, transferir 1 ml de la suspensión de microorganismos de prueba y efectuar diluciones decimales necesarias para obtener placas con cuentas de entre 25 y 250 colonias. Colocar en cajas 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 por 48 h a 30-35° C. Contar las colonias de cada una de las cajas en un cuenta colonias de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999. Métodos generales de análisis-determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas

A.10. Consideraciones para realizar la prueba de eficiencia en reducción bacteriana en equipos y sustancias germicidas.

A continuación se establecen las características fisicoquímicas del agua que debe emplearse para llevar a cabo las pruebas 1 y 2, tanto para los equipos como para las sustancias germicidas.

A.10.1 Características fisicoquímicas del agua que se utilizará en la prueba para equipos y/o sustancias germicidas.

La prueba de la eficiencia en reducción bacteriana tanto en equipos como en sustancias, se llevará a cabo con dos aguas de prueba, las cuales serán preparadas diariamente y verificadas conforme a las Tablas A.3 y A.4 de esta Norma.

Los parámetros de las Tablas A.3 y A.4 de esta Norma, deberán ser analizados por un Tercero Autorizado por COFEPRIS.

A.10.1.1 Agua de prueba 1.

Este tipo de agua representa a las aguas subterráneas de alta calidad o el agua de lluvia, y será inyectada desde el inicio hasta el 50% de la Vida útil de cada equipo y por cada sustancia germicida, la cual debe cumplir con las especificaciones siguientes:

Tabla A.3

Agua de Prueba 1			
Constituyente		**Especificación**	**Materiales de ajuste (# CAS [2])**
Cloro [1]	(mg / L)	< 0,1 mg / L	Ninguno
pH		6,5-9,0 Unidades de pH	Ácido o una base inorgánica Ácido clorhídrico (7647-01-0) Hidróxido de sodio (1310-73-2)
COT	(mg/L)[3]	1.5±0.95 mg/L	Ácido tánico (1401-55-4)
Turbidez	(NTU)	<1 NTU	Ningún ajuste
Temperatura	(°C)	Temperatura ambiente	No aplica
SDT (mg/L)	(mg / L)	450 ± 50 mg / L	Sales del Mar

[1] Todo el cloro debe ser removido por debajo de los límites de detección sin añadir productos químicos y comúnmente se logra mediante el uso de carbón activado. El cloro debe ser medido antes de la adición de los materiales de ajuste del agua de prueba. Los niveles de cloro en el agua de prueba 2 puede causar interferencias con la técnica analítica; Las mediciones deben hacerse antes de la adición de las Sales del Mar.

[2] Iniciales en Inglés del Servicio de Información de Sustancias Químicas de la Sociedad Americana de Química de los Estados Unidos de América (Chemical Abstract Service).

Si el agua de la llave tiene una composición similar a ésta, puede usarse directamente después de su decloración, deberá demostrarse con estudios si es el caso.

A.10.1. 2 Agua de prueba 2.

Este tipo de agua representa a las aguas superficiales, pero en las peores condiciones, y será inyectada a partir del 51 % hasta el 100 % de la Vida útil de cada equipo y por cada sustancia germicida, la cual debe cumplir con las siguientes especificaciones:

Tabla A.4

Agua de Prueba 2			
Constituyente		**Especificación**	**Materiales de ajuste (# CAS [2])**
Cloro [1]	(mg / L)	< 0.1 mg / L	Ninguno
pH		6.0-10.0 Unidades de pH	Ácido o una base inorgánica Ácido clorhídrico (7647-01-0) Hidróxido de sodio (1310-73-2)
COT	(mg/L)3	15±5 mg/L	Ácido húmicos (6813-04-4)
Turbidez	(NTU)[3]	40 ± 10 NTU	Especificación ISO. Polvo de prueba fina 12103-A2

Agua de Prueba 2			
Constituyente		**Especificación**	**Materiales de ajuste (# CAS [2])**
Temperatura	(°C)	Temperatura ambiente	No aplica
STD (mg/L)	(mg / L)	1500 ± 150 mg/L	Sales del Mar

[1] Todo el cloro debe ser removido por debajo de los límites de detección sin añadir productos químicos y comúnmente se logra mediante el uso de carbón activado El cloro debe ser medido antes de la adición de los materiales de ajuste del agua de prueba. Los niveles de cloro en el agua de prueba 2 pueden causar interferencias con la técnica analítica. Las mediciones deben hacerse antes de la adición de Sales del Mar.

[2] Iniciales en Inglés del Servicio de Información de Sustancias Químicas de la Sociedad Americana de Química de los Estados Unidos de América (Chemical Abstract Service).

A.10. 2 Preparación del agua de prueba 1 y del agua de prueba 2.

Para preparar el agua de prueba 1 y 2 que se ajustará a los parámetros especificados en las Tablas A.3 y A.4 del Apéndice A Normativo de esta Norma, se debe utilizar agua libre de Bactericidas y Bacteriostáticos (para garantizar lo anterior, se recomienda realizar dicha actividad mediante un equipo que contenga filtros de Carbón Activado).

A.10.2.1 Los volúmenes de agua de prueba 1, se prepararán y se harán pasar a través del equipo, hasta alcanzar el 50 % de la Vida útil especificada por el fabricante, de acuerdo con el tiempo determinado de su operación o funcionamiento.

A.10.2.2 Los volúmenes de agua de prueba 2 se prepararán y se harán pasar a través del equipo, después del 50 % de la Vida útil, hasta alcanzar el 100 % de la Vida útil especificada por el fabricante, de acuerdo con el tiempo determinado de su operación o funcionamiento.

A.10.3 Inoculación del agua de prueba 1 y del agua de prueba 2.

Se inocularán un mínimo de 10 Volúmenes vacíos del agua de prueba 1 y del agua de prueba 2, cuando les aplique (considerando que cada Volumen vacío no debe ser menor a 1 L), con el volumen de suspensión bacteriana de *Escherichia coli*, hasta alcanzar:

A.10.3.1 Una carga total de Mesófilos aerobios de 5000 a 10000 UFC/ml y determinar la concentración real de conformidad con lo dispuesto en la Norma Oficial Mexicana citada en el inciso 3.3 Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1994) del Capítulo de Referencias normativas de esta Norma.

A.10.3.2 Una concentración de Coliformes totales mayor o igual a 1600 NMP/100 ml y determinar la concentración real mediante el Apéndice H Normativo de la Norma Oficial Mexicana citada en el inciso 3.8 (NOM-210-SSA1-2014) del Capítulo de Referencias normativas de esta Norma o con los métodos alternativos presentados en los Apéndices B y C Informativos de esta Norma.

Las aguas de prueba 1 y 2 inoculadas, deben estar bien mezcladas antes de usarse.

A.10.4 Muestreo.

El procedimiento de toma de muestras (desinfección y muestreo) se realizará de conformidad con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana citada en el inciso 3.9 (NOM-230-SSA1-2002) del Capítulo de Referencias normativas de esta Norma.

A.10.4.1 Neutralizadores químicos para las sustancias germicidas y equipos que en su tratamiento utilizan sustancias desinfectantes.

En el momento en el que se toman las muestras, el producto químico desinfectante presente en el agua deberá de neutralizarse inmediatamente (es decir, convertirse a una forma que carezca de actividad antimicrobiana), sino se sobreestimará la eliminación o inactivación microbiana, esto se realiza agregando un neutralizador idóneo a las muestras, según la sustancia que se trate, para lo cual el fabricante de la sustancia o equipo deberá indicar en el instructivo o manual de uso, el neutralizador que aplique, indicando la concentración en porcentaje a aplicar por ml de la muestra, por ejemplo:

Para muestras de agua con cloro residual libre, agregar 0.1 ml de tiosulfato de sodio a 3 % por cada 120 ml de capacidad de los recipientes que contendrá la muestra.

A.10.5 Selección de los equipos.

Se seleccionarán dos equipos del mismo modelo por el laboratorio Tercero Autorizado, en caso de equipos muestra prototipos o muestras de importación donde no pueda llevar a cabo la selección se tomarán los existentes debiendo justificar documentalmente por el interesado.

A.10.6 Análisis microbiológicos.

Los análisis microbiológicos se realizarán determinando la concentración de microorganismos Mesófilos aerobios en UFC/ml de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana citada en el inciso 3.3 (NOM-092-SSA1-1994) del Capítulo de Referencias normativas de esta Norma y la concentración de coliformes totales de acuerdo con el Apéndice H Normativo de la Norma Oficial Mexicana citada en el inciso 3.8 (NOM-210-SSA1-2014) del Capítulo de Referencias normativas de esta Norma o con los métodos alternativos presentados en los Apéndices B y C Informativos de esta Norma, referentes al agua tratada por los equipos y /o sustancias germicidas.

A.10.7 Bitácora.

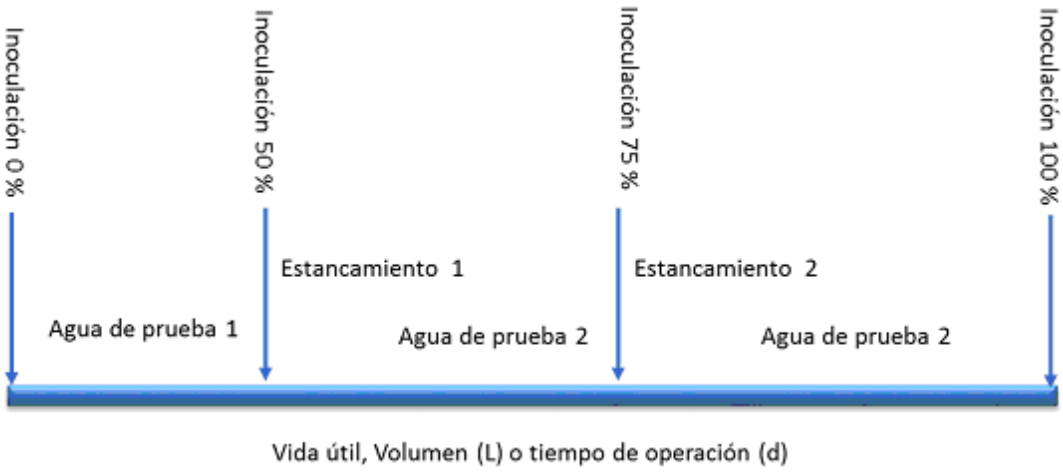
El técnico de laboratorio asentará en la bitácora los registros de los flujos de agua y presiones de partida, así como de los mismos en que termina diariamente. En la toma de muestras se deberán registrar en la bitácora los siguientes datos: fecha, hora, volumen en L de agua tratada, flujo en L por minuto y presión de operación, así como el registro de las cantidades de microorganismos obtenidas antes y después del tratamiento.

A.10.8 Etapas de evaluación.

Para documentar la reproducibilidad de la eficiencia en reducción bacteriana y determinar su variabilidad, serán evaluados en paralelo con agua de prueba 1 y agua de prueba 2, dos equipos del mismo modelo en las siguientes etapas de la vida útil: al 0 %, 50 %, después del periodo de estancamiento de 48 h, al 75%, después del periodo de estancamiento de 48 h y finalmente, 100%, bajo el esquema mostrado en la Figura A.1 del Apéndice A Normativo de esta Norma.

Para documentar la reproducibilidad de la eficiencia en reducción bacteriana y determinar su variabilidad, serán evaluadas por duplicado las sustancias germicidas del mismo lote, agregándolas al agua de prueba 1 y agua de prueba 2, considerando su caducidad de acuerdo a los estudios de estabilidad.

Figura A.1. Verificación en operación continúa de la eficiencia en reducción bacteriana en equipos domésticos



A.11. Proceso de evaluación en el banco de pruebas, de los equipos en sistema continúo, por lotes (Discontinúo) y de las sustancias germicidas, para determinar la eficiencia en reducción bacteriana de la vida útil.

A.11.1 Equipos en sistema continúo.

Con base en las especificaciones que se indican en el manual o instructivo de uso y mantenimiento del equipo sujeto a prueba, se elabora un programa de evaluación de eficiencia en reducción bacteriana de la vida útil del equipo a ser evaluado, considerando:

La vida útil de los componentes que dan tratamiento al agua, la sustitución de algún componente en el caso de que alguno de éstos tenga una vida útil menor al equipo en su totalidad.

El mantenimiento y/o limpieza que se debe de dar al equipo y/o sus componentes.

El flujo de agua en L por minuto a la que se debe operar el equipo.

Presión máxima de alimentación de agua a la que se opera el equipo.

Cuando se opere el equipo con recirculación del agua de prueba 1 y 2 se deberán de mantener los parámetros ajustados (Tablas A.3 y A.4 de esta Norma), de acuerdo a la capacidad del banco de pruebas y gasto del equipo. En caso de no recircular el agua, se deberá de preparar la cantidad suficiente de agua de prueba 1 y 2 de acuerdo al gasto, presión y a los tiempos establecidos a los que operará el equipo.

A.11.1.1 Banco de pruebas e instalación de equipos.

Verificar el adecuado funcionamiento de la instalación del banco de pruebas (válvulas, bombas, manómetros, etc.).

Desinfectar el banco de pruebas y líneas de conducción con solución de Cloro al 0.2 % durante 30 minutos y enjuagar hasta eliminar los residuales de Cloro, se puede considerar el uso de otro desinfectante.

Instalar en paralelo en el banco de pruebas, (sistema continúo Figura A1 de esta Norma), dos equipos del mismo Modelo, verificar que se encuentren debidamente armados e instalados.

A.11.1.2 Acondicionamiento de los equipos.

Acondicionar y operar cada equipo de acuerdo con el programa elaborado para la evaluación de la Eficiencia en reducción bacteriana del equipo, considerando:

Flujo de agua en L/minuto: Ajustar las condiciones de flujo de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante, indicadas en el manual de uso y mantenimiento del equipo.

Presión de alimentación de agua: Ajustar el medidor a cero, tomar las lecturas iniciales de los dispositivos de medición e iniciar la presurización, hasta alcanzar la presión a la que se operara el equipo.

Vida útil y mantenimiento o sustitución de los componentes del equipo que proporcionan tratamiento al agua: Se debe considerar en la prueba, el ciclo de limpieza y/o el cambio de componentes (se deberá contar con los componentes necesarios que se sustituirán durante el desarrollo de la prueba).

Tiempo de funcionamiento de los equipos: Será conforme a lo especificado por el fabricante. Si el fabricante no especifica el tiempo de funcionamiento diario del equipo a evaluar, este debe ser máximo de 16 h con un periodo de descanso de 8 h.

A.11.1.3 Desarrollo.

Se llena el sistema de prueba, con agua de prueba 1, para purgar el aire del sistema.

Para cada equipo, se dejan pasar dos Volúmenes vacíos de agua o lo que indique el manual y/o instructivo del fabricante.

Inspeccionar el sistema hidráulico y equipos periódicamente, verificando que se encuentran debidamente armados e instalados, para comprobar que no se presentan fugas de agua en los 2 equipos ni en las conexiones y válvulas del banco de pruebas.

El técnico de laboratorio asentará en la bitácora los registros de los flujos de agua y presiones de partida, así como de los mismos en que termina diariamente.

A.11.1.3.1 Para el 0 % de la vida útil del equipo.

Una vez iniciado el flujo de agua conforme a las indicaciones establecidas en el programa para la evaluación del equipo, se harán pasar a través de los equipos por lo menos 2 volúmenes vacíos de agua de prueba 1.

Posteriormente, se hacen pasar 10 volúmenes vacíos de agua de prueba 1 inoculada a través de los equipos.

Se tomarán 2 muestras del agua de prueba 1 inoculada por cada equipo (en la válvula de muestreo instalada en el banco de pruebas, con un volumen de 100 ml) en el influente (antes del tratamiento de agua por el equipo), esta es la muestra ingresada, que dará la carga inicial de microorganismos con los que se comienza.

A continuación, se toman 2 muestras por equipo en el efluente (después del tratamiento de agua por el equipo), con un volumen de 100 ml, la inyección de la suspensión con los microorganismos en el flujo de alimentación continuará durante la toma de muestras hasta que el volumen sea suficiente para el análisis de desafío.

Realizar el análisis microbiológico de las muestras recolectadas conforme lo indicado en el inciso A.10.6 de este Apéndice.

Determinar la Eficiencia en Reducción Bacteriana, conforme con lo indicado en el inciso A.13 de este Apéndice.

A.11.1.3.2 Para el 50 % de la vida útil del equipo.

Reiniciar el flujo de agua de prueba 1 de acuerdo con las indicaciones establecidas en el programa para la evaluación del equipo, se hará pasar ésta a través de los equipos hasta cubrir el 50 % de la vida útil.

Posteriormente, se hacen pasar 10 volúmenes vacíos de agua de prueba 1 inoculada a través de los equipos.

Se tomarán 2 muestras del agua de prueba 1 inoculada por cada equipo (en la válvula de muestreo instalada en el banco de pruebas, con un volumen de 100 ml) en el influente (antes del tratamiento de agua por el equipo), ésta es la muestra ingresada, que dará la carga inicial de microorganismos con los que se comienza.

A continuación, se toman 2 muestras por equipo en el efluente (después del tratamiento de agua por el equipo), con un volumen de 100 ml, la inyección de la suspensión de los microorganismos en el flujo de alimentación continuará durante la toma de muestras hasta que el volumen sea suficiente para el análisis de desafío.

Realizar el análisis microbiológico de las muestras recolectadas de acuerdo con lo indicado en el inciso A.10.6 de este Apéndice.

Determinar la Eficiencia en Reducción Bacteriana, de acuerdo con lo indicado en el inciso A.13 de este Apéndice.

A.11.1.3.3 Estancamiento 1.

Una vez cubierto el 50 % de la vida útil de los equipos, se tendrá un periodo de estancamiento de 48 h, es decir, no se hará pasar agua de prueba 1 inoculada y no inoculada. Esto permite la determinación de cualquier crecimiento microbiano a través del componente de tratamiento, o el paso de microorganismos en reposo, cuando los equipos no estén sujetos a presión en línea.

Terminado el periodo de estancamiento se continuará con el agua de prueba 2.

A.11.1.3.4 Para el 75% de la vida útil del equipo.

Reiniciar el flujo de agua de prueba 2, de acuerdo con las indicaciones establecidas en el programa para la evaluación del equipo, se hará pasar ésta a través de los equipos hasta cubrir el 75 % de la vida útil.

Posteriormente, se hacen pasar 10 Volúmenes vacíos de agua de prueba 2 inoculada a través de los equipos.

Se tomarán 2 muestras del agua de prueba 2 inoculada por cada equipo (en la válvula de muestreo instalada en el banco de pruebas, con un volumen de 100 ml) en el influente (antes del tratamiento de agua por el equipo), esta es la muestra ingresada, que dará la carga inicial de microorganismos con los que se comienza.

A continuación, se toman 2 muestras por equipo en el efluente (después del tratamiento de agua por el equipo), con un volumen de 100 ml, la inyección de la suspensión con los microorganismos en el flujo de alimentación continuará durante la toma de muestras hasta que el volumen sea suficiente para el análisis de desafío.

Realizar el análisis microbiológico de las muestras recolectadas de acuerdo con lo indicado en el inciso A.10.6 de este Apéndice.

Determinar la eficiencia en reducción bacteriana, de acuerdo con lo indicado en el inciso A.13 de este Apéndice.

A.11.1.3.5 Estancamiento 2.

Una vez cubierto el 75% de la vida útil de los equipos, se tendrá un periodo de estancamiento de 48 h, es decir, no se hará pasar agua de prueba 2 inoculada y no inoculada. Esto permite la determinación de cualquier crecimiento microbiano a través del componente de tratamiento, o el paso de microorganismos en reposo, cuando los equipos no estén sujetos a presión en línea.

Terminado el periodo de estancamiento se continuará con el agua de prueba 2.

A.11.1.3.6 Para el 100% de la vida útil del equipo.

Reiniciar el flujo de agua de prueba 2 de acuerdo con las indicaciones establecidas en el programa para la evaluación del equipo, se hará pasar ésta a través de los equipos hasta cubrir el 100% de la vida útil.

Posteriormente, se hacen pasar 10 volúmenes vacíos de agua de prueba 2 inoculada a través de los equipos.

Se tomarán 2 muestras del agua de prueba 2 inoculada por cada equipo (en la válvula de muestreo instalada en el banco de pruebas, con un volumen de 100 ml) en el influente (antes del tratamiento de agua por el equipo), esta es la muestra ingresada, que dará la carga inicial de microorganismos con los que se comienza.

A continuación, se toman 2 muestras por equipo en el efluente (después del tratamiento de agua por el equipo), con un volumen de 100 ml, la inyección de la suspensión con los microorganismos en el flujo de alimentación continuará durante la toma de muestras hasta que el volumen sea suficiente para el análisis de desafío.

Realizar el análisis microbiológico de las muestras recolectadas de acuerdo con lo indicado en el inciso A.10.6 de este Apéndice.

Determinar la eficiencia en reducción bacteriana, de acuerdo con lo indicado en el inciso A.13 de este Apéndice.

A.11.1.4 Criterio para obtener el CEB.

El criterio para la obtención del CEB para los equipos y otros parámetros, será de acuerdo a lo indicado en el inciso 6.5, de esta Norma.

A.11.1.5 Alternativa para el cálculo de la carga microbiana en el agua de prueba.

Para sistemas continuos Figura A.2, de esta Norma, se puede calcular el flujo de solución concentrada de la carga bacteriana que deberá bombearse y mezclarse e inocularse en el agua de prueba 1 o 2, pueden realizarse los cálculos siguientes:

$$C_{AP}Q_{AP} + C_{TM}Q_{TM} = C_TQ_T$$

$$Q_{AP} + Q_{TM} = Q_T$$

Donde:

C_{AP}= Carga microbiana en el tanque de agua de prueba, UFC/ml o NMP/100 ml

Q_{AP} = Flujo del tanque de agua de prueba, L/ minuto

C_{TM} = Carga microbiana en el tanque de la solución concentrada, UFC/ml o NMP/100 ml

Q_{TM} = Flujo de la solución concentrada, L/ minuto

C_T = Flujo total ingresado al equipo sometido a verificación, L/ minuto

Q_T= Carga microbiana ingresada al equipo sometido a verificación, 1×10^4 UFC/ml o 1.6×10^3 NMP/100 ml

Por lo general, los equipos domésticos operan en el intervalo de 1-5 L/ minuto, es decir que el volumen diario iría de 1,440 L – 7,200 L, por lo que el Flujo de la solución concentrada puede calcularse mediante:

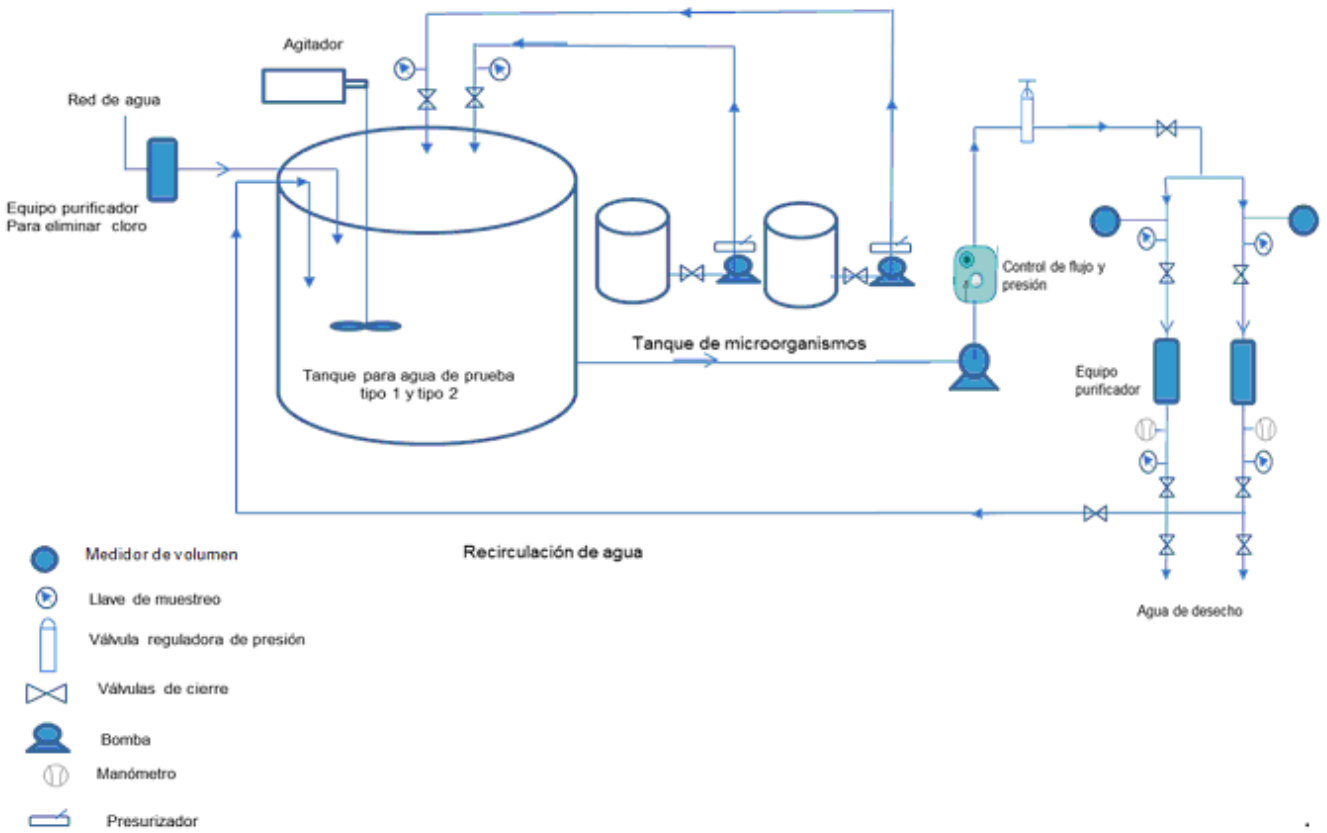
$$C_{TM} = \frac{\left[\left(1\,x\frac{10^4 UFC}{ml}\right) \acute{o} \left(1.6\frac{NMP}{100\,ml}\right)\right]\ x\ (Q_T,\ L/min))}{(1 - Q_{AP}),\frac{L}{min}}$$

De la ecuación anterior puede observarse que la concentración de la solución depende directamente del flujo total de operación pero inversamente proporcional al flujo de agua problema, por lo que deberá elegirse el factor técnico y operativamente conveniente de la relación:

$$\frac{Q_{AP}}{Q_T} = factor\ \alpha\ (adimensional)$$

Figura A.2

Sistema de circulación continuo



A.11.2 Equipos por Lotes (Discontinúo).

Con base en las especificaciones que se indican en el manual o instructivo de uso y mantenimiento del equipo sujeto a prueba, se elabora un programa de evaluación de eficiencia en reducción bacteriana de la vida útil del equipo a ser evaluado, considerando:

La vida útil de los componentes que dan tratamiento al agua, la sustitución de algún componente en el caso de que alguno de éstos tenga una vida útil menor al equipo en su totalidad.

El mantenimiento y/o limpieza que se debe de dar al equipo y/o sus componentes

A.11.2.1 Banco de pruebas e instalación de equipos.

Verificar el adecuado funcionamiento de la instalación del banco de pruebas.

Desinfectar el banco de pruebas y líneas de conducción con solución de Cloro al 0.2 % durante 30 minutos y enjuagar hasta eliminar los residuales de Cloro.

Instalar en el banco de pruebas, dos equipos del mismo modelo en el sistema por lotes (Figura A.4 de esta Norma) para documentar la reproducibilidad de la eficiencia y determinar su variabilidad, siguiendo las recomendaciones del fabricante y verificar que se encuentren debidamente armados e instalados, así mismo que no se presenten fugas en los equipos, ni en las conexiones.

A.11.2.2 Acondicionamiento de los equipos.

Ajustar el flujo de agua, en caso de ser necesario.

A.11.2.3 Alternativa para probar a un equipo por lotes a un flujo continuo de agua.

De acuerdo a la Figura A.4 de esta Norma y partiendo de la carga máxima (volumen) del equipo y del tiempo de residencia de tratamiento del agua, se podrá establecer el modo de operación continuo.

En un equipo por lotes se puede considerar la siguiente alternativa para probarlo como si fuera uno de flujo continuo de agua considerando como variables de operación el flujo de ingreso, tiempo de residencia y flujo de salida del equipo de tratamiento, tal como se muestra en la Figura A.3, siguiente:

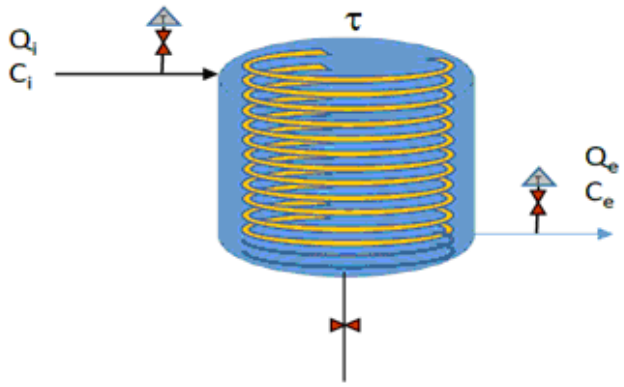


Figura A.3. Variables de operación de un sistema por Lotes.

Donde:

Q_i = Flujo de ingreso de agua cruda, L/ minuto

C_i = Concentración inicial de contaminante, m/ L, donde m = unidad másica respectiva.

Q_e = Flujo del efluente del agua tratada, L/ minuto

Ce = Concentración residual del contaminante, m/L, donde m = unidad másica respectiva.

τ = tiempo de residencia, es el tiempo que el agua tarda en ser tratado dentro del equipo.

Sin embargo, el tiempo de residencia (τ) define la efectividad del proceso puesto que el tiempo al que el agua es sometida al tratamiento indicado por el fabricante, por lo que puede dimensionarse la operación continua del equipo manteniendo el tiempo de residencia indicado por el equipo, calculando entonces los flujos de operación.

El tiempo de residencia está dado por:

$$\tau = \frac{V\ (L)}{Q_e\ (\frac{L}{min})}$$

Es decir, depende directamente del volumen de agua (V) que el equipo puede tratar e inversamente proporcional al flujo del efluente (Q_e).

Suponiendo que el equipo de la Figura A.3, de esta Norma, puede tratar 25 L de agua con un tiempo de residencia de 2 h, esto significa que el flujo del efluente será de:

$$Q_e = \frac{V\ (L)}{t\ (min)}$$

Por lo que realizando las conversiones correspondientes,

$$Q_e = \frac{25\ L}{2\ h\ \frac{60 min}{1\ h}} = 0.2083\ L/min$$

Es decir, que mediante este flujo del influente cada unidad de volumen de agua tendrá un tiempo de residencia de 2 h a través del equipo, pero su factibilidad técnica dependerá del flujo mínimo de operación del banco de pruebas instalado.

A.11.2.4 Desarrollo.

Se llena el sistema de prueba, con agua de prueba 1, para purgar el aire del sistema.

Inspeccionar el sistema hidráulico y equipos periódicamente, verificando que se encuentran debidamente armados e instalados.

El técnico de laboratorio asentará en la bitácora los registros de los flujos de agua y presiones de partida, así como de los mismos en que termina diariamente.

A.11.2.4.1 Para el 0% de la vida útil del equipo.

Una vez iniciado el flujo de agua de acuerdo con las indicaciones establecidas en el programa para la evaluación del equipo, se harán pasar a través de los equipos por lo menos 2 lotes de agua de prueba 1.

Posteriormente, se hacen pasar a través de los equipos 2 lotes de agua de prueba 1 inoculada.

Se tomarán 2 muestras del agua de prueba 1 inoculada por cada equipo (en la válvula de muestreo instalada en el banco de pruebas, con un volumen de 100 ml) en el influente (antes del tratamiento de agua por el equipo), esta es la muestra ingresada, que dará la carga inicial de microorganismos con los que se comienza.

Se toman 2 muestras del agua tratada, después de que el volumen suficiente del agua de prueba 1 inoculada ha pasado a través del equipo, asegurarse que la inyección de la suspensión con los microorganismos en el flujo de alimentación continua durante la toma de muestras hasta que el volumen sea suficiente (100 ml) para el análisis de desafío.

Realizar el análisis microbiológico de las muestras recolectadas de acuerdo con lo indicado en el inciso A.10.6 de este Apéndice.

Determinar la Eficiencia en Reducción Bacteriana, de acuerdo con lo indicado en el inciso A.13 de este Apéndice.

A.11.2.4.2 Para el 50% de la vida útil del equipo.

Se hacen pasar los lotes necesarios de agua de prueba 1 a través de los equipos, hasta cubrir el 50% de la vida útil.

Posteriormente, se hace pasar a través de los equipos 2 lotes de agua de prueba 1 inoculada.

Se tomarán 2 muestras del agua de prueba 1 inoculada por cada equipo (en la válvula de muestreo instalada en el banco de pruebas, con un volumen de 100 ml) en el influente (antes del tratamiento de agua por el equipo), esta es la muestra ingresada, que dará la carga inicial de microorganismos con los que se comienza.

Se toman 2 muestras del agua tratada, después de que el volumen suficiente del agua de prueba 1 inoculada ha pasado a través del equipo, asegurarse que la inyección de la suspensión con los microorganismos en el flujo de alimentación continua durante la toma de muestras hasta que el volumen sea suficiente (100 ml) para el análisis de desafío.

Realizar el análisis microbiológico de las muestras recolectadas de acuerdo con lo indicado en el inciso A.10.6 de este Apéndice.

Determinar la eficiencia en reducción bacteriana, de acuerdo con lo indicado en el inciso A.13 de este Apéndice.

A.11.2.4.3 Estancamiento 1.

Una vez cubierto el 50 % de la vida útil de los equipos, se tendrá un periodo de estancamiento de 48 h, es decir, no se hará pasar agua de prueba 1 inoculada y no inoculada. Esto permite la determinación de cualquier crecimiento microbiano a través del componente de tratamiento, o el paso de microorganismos en reposo, cuando los equipos no estén sujetos a presión en línea.

Terminado el periodo de estancamiento se continuará con el agua de prueba 2.

A.11.2.4.4 Para el 75% de la vida útil del equipo.

Se hacen pasar los lotes necesarios de agua de prueba 2 a través de los equipos, hasta cubrir el 75% de la vida útil.

Posteriormente, se hace pasar a través de los equipos 2 lotes de agua de prueba 2 inoculada.

Se tomarán 2 muestras del agua de prueba 2 inoculada por cada equipo (en la válvula de muestreo instalada en el banco de pruebas, con un volumen de 100 ml) en el influente (antes del tratamiento de agua por el equipo), esta es la muestra ingresada, que dará la carga inicial de microorganismos con los que se comienza.

Se toman 2 muestras del agua tratada, después de que el volumen suficiente del agua de prueba 2 inoculada ha pasado a través del equipo, asegurarse que la inyección de la suspensión con los microorganismos en el flujo de alimentación continua durante la toma de muestras hasta que el volumen sea suficiente (100 ml) para el análisis de desafío.

Realizar el análisis microbiológico de las muestras recolectadas de acuerdo con lo indicado en el inciso A.10.6 de este Apéndice.

Determinar la Eficiencia en Reducción Bacteriana, de acuerdo con lo indicado en el inciso A.13 de este Apéndice.

A.11.2.4.5 Estancamiento 2.

Una vez cubierto el 75% de la vida útil de los equipos, se tendrá un periodo de estancamiento de 48 h, es decir, no se hará pasar agua de prueba 2 inoculada y no inoculada. Esto permite la determinación de cualquier crecimiento microbiano a través del componente de tratamiento, o el paso de microorganismos en reposo, cuando los equipos no estén sujetos a presión en línea.

A.11.2.4.6 Para el 100% de la vida útil del equipo.

Se hacen pasar los lotes necesarios de agua de prueba 2 a través de los equipos, hasta cubrir el 100% de la vida útil.

Posteriormente, se hacen pasar a través de los equipos 2 lotes de agua de prueba 2 inoculada.

Se tomarán 2 muestras del agua de prueba 2 inoculada por cada equipo (en la válvula de muestreo instalada en el banco de pruebas, con un volumen de 100 ml) en el influente (antes del tratamiento de agua por el equipo), ésta es la muestra ingresada, que dará la carga inicial de microorganismos con los que se comienza.

Se toman 2 muestras del agua tratada, después de que el volumen suficiente del agua de prueba 2 inoculada ha pasado a través del equipo, asegurarse que la inyección de la suspensión con los microorganismos en el flujo de alimentación continua durante la toma de muestras hasta que el volumen sea suficiente (100 ml) para el análisis de desafío.

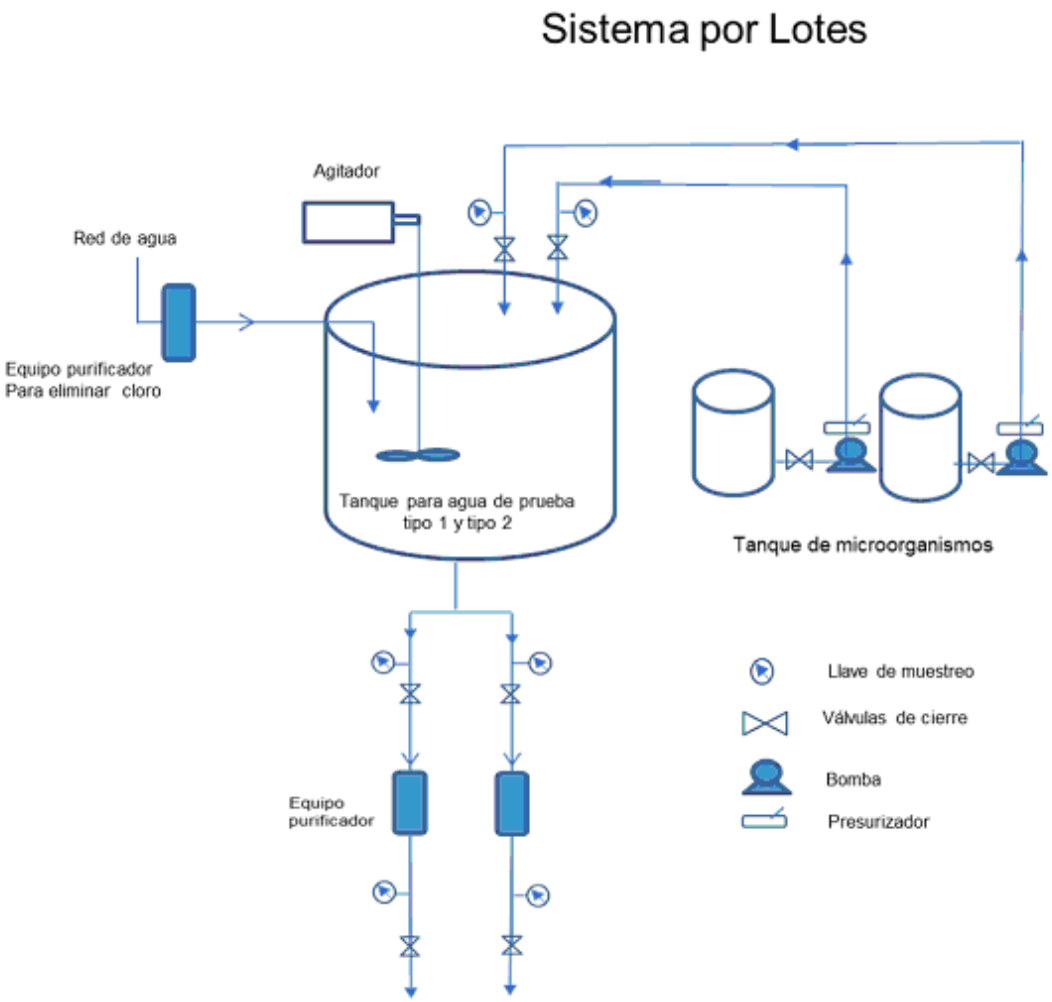
Realizar el análisis microbiológico de las muestras recolectadas de acuerdo con lo indicado en el inciso A.10.6 de este Apéndice.

Determinar la eficiencia en reducción bacteriana, de acuerdo con lo indicado en el inciso A.13, de este Apéndice.

A.11.2.5 Criterio para obtener el CEB.

El criterio para la obtención del CEB para los equipos y otros parámetros, será de acuerdo a lo indicado en el inciso 6.5 este Apéndice.

Figura A.4


Sistema por Lotes
Agitador
Red de agua
Equipo purificador
Para eliminar cloro
Tanque para agua de prueba
tipo 1 y tipo 2
Tanque de microorganismos
Equipo
purificador
Llave de muestreo
Válvulas de cierre
Bomba
Presurizador

A.11.3 Procedimiento de la prueba para las sustancias germicidas.

A.11.3.1 Desarrollo de la prueba, con el agua de prueba 1.

La eficiencia en reducción bacteriana para las sustancias germicidas se realizará: (1).- Con un producto original de un lote y (2).- Para corroborar la caducidad de la sustancia germicida, se realizará a un producto del mismo lote que haya sido sometido a estudios de estabilidad efectuados a temperatura ambiente, sino cuenta con ellos podrá presentar un producto del mismo lote que haya sido sometido a estudios a temperatura acelerada, y en la renovación del CEB deberá de presentar un producto del mismo lote que haya sido sometido a estudio de estabilidad a temperatura ambiente, esto nos permitirá conocer la caducidad real de la sustancia. La prueba de eficiencia en reducción bacteriana se realizará utilizando agua de prueba 1 (Tablas A.3 de este Apéndice) conforme a lo siguiente:

A dos piezas de la sustancia germicida del mismo lote, previamente seleccionadas por el Tercero Autorizado, se les realizará la evaluación de eficiencia en reducción bacteriana, considerando las siguientes especificaciones, que se indican en la etiqueta o instructivo de la sustancia sujeta a prueba:

Volumen de agua en L que trata la sustancia germicida.

Dosis del desinfectante químico (las indicadas en la etiqueta y/o instructivo de uso).

Tiempo de contacto.

Mezclado.

Condiciones de almacenamiento del agua desinfectada.

Agregar a dos recipientes el volumen de agua de prueba 1 Inoculada, indicado en la etiqueta o Instructivo.

Tomar 3 muestras (con un volumen de 100 ml) del agua de prueba 1 inoculada, en cada uno de los recipientes (antes del tratamiento de agua por la sustancia germicida), esta es la muestra ingresada, que dará la carga inicial de microorganismos con los que se comienza.

Agregar al agua de prueba 1 Inoculada, la dosis de la sustancia germicida especificada en la etiqueta o instructivo.

Dejar transcurrir el tiempo de contacto indicado en la etiqueta o instructivo.

Después de transcurrido el tiempo de contacto especificado en la etiqueta o instructivo, tomar tres muestras (con un volumen de 100 ml) del agua de prueba 1 inoculada y tratada por la sustancia germicida.

En el momento en el que se toman las muestras, el producto químico desinfectante presente en el agua deberá de neutralizarse inmediatamente (es decir, convertirse a una forma que carezca de actividad antimicrobiana), sino se sobreestimará la eliminación o inactivación microbiana, esto se realiza agregando un neutralizador idóneo a las muestras, según la sustancia que se trate.

Realizar el análisis microbiológico de las muestras recolectadas de acuerdo con lo indicado en el inciso A.10.6 de este Apéndice.

Determinar la Eficiencia en Reducción Bacteriana, de acuerdo con lo indicado en el inciso A.13 de este Apéndice.

A.11.3.2 Desarrollo de la prueba, con el agua de prueba 2.

La eficiencia en reducción bacteriana para las sustancias germicidas se realizará: (1).- Con un producto original de un lote y (2).- Para corroborar la caducidad de la sustancia germicida, se realizará a un producto del mismo lote que haya sido sometido a estudios de estabilidad efectuados a temperatura ambiente, sino cuenta con ellos podrá presentar un producto del mismo lote que haya sido sometido a estudios a temperatura acelerada, y en la renovación del CEB deberá de presentar un producto del mismo lote que haya sido sometido a estudio de estabilidad a temperatura ambiente, esto nos permitirá conocer la Caducidad real de la sustancia. La prueba de eficiencia en reducción bacteriana se realizará utilizando agua de prueba 2 (Tablas A.4 de este Apéndice) conforme a lo siguiente:

A dos piezas de la sustancia germicida del mismo lote, previamente muestreadas por el Tercero Autorizado, se les realizará la evaluación de eficiencia en reducción bacteriana de la vida útil, considerando las siguientes especificaciones, que se indican en la etiqueta o Instructivo de la sustancia sujeta a prueba:

Volumen de agua en L que trata la sustancia germicida.

Dosis del desinfectante químico (medida en las unidades apropiadas).

Tiempo de contacto.

Mezclado.

Condiciones de almacenamiento del agua desinfectada.

Agregar a dos recipientes el volumen de agua de prueba 2 Inoculada, indicado en la etiqueta o instructivo.

Tomar 3 muestras (con un volumen de 100 ml) del agua de prueba 2 inoculada, en cada uno de los recipientes (antes del tratamiento de agua por la sustancia germicida), esta es la muestra ingresada, que dará la carga inicial de microorganismos con los que se comienza.

Agregar al agua de prueba 2 Inoculada, la dosis de la sustancia germicida especificada en la etiqueta o instructivo.

Dejar transcurrir el tiempo de contacto indicado en la etiqueta o instructivo.

Después de transcurrido el tiempo de contacto especificado en la etiqueta o instructivo, tomar tres muestras (con un volumen de 100 ml) del agua de prueba 2 inoculada y tratada por la sustancia germicida.

En el momento en el que se toman las muestras, el producto químico desinfectante presente en el agua deberá de neutralizarse inmediatamente (es decir, convertirse a una forma que carezca de actividad antimicrobiana), sino se sobreestimará la eliminación o inactivación microbiana, esto se realiza agregando un neutralizador idóneo a las muestras, según la sustancia que se trate.

Realizar el análisis microbiológico de las muestras recolectadas de acuerdo con lo indicado en el inciso A.10.6 de este Apéndice.

Determinar la eficiencia en reducción bacteriana, de acuerdo con lo indicado en el inciso A.13 de este Apéndice.

A.11.3.3 Criterio para obtener el CEB de las sustancias germicidas.

Las sustancias germicidas deberán ser sometidas a prueba con el agua de prueba 1 y agua de prueba 2, demostrando una eficiencia en reducción bacteriana igual o mayor al 95 % de mesófilos aerobios y mayor o igual al 99.99 % de coliformes totales.

Cuando una de las dos sustancias germicidas (producto del mismo lote sometido a estudios de estabilidad), no pase alguna prueba de eficiencia en reducción bacteriana, no se otorgará el CEB.

A.12. Consideraciones especiales para técnicas específicas que se deben tomar en cuenta durante la prueba para equipos y/o sustancias germicidas para tratamiento doméstico de agua.

La prueba para determinar la eficiencia en reducción bacteriana depende del tipo de equipo o sustancia germicida a evaluar, a continuación, se muestran en las Tablas A.5, A.6, A.7 y A.8 de esta Norma, algunas consideraciones de las diversas técnicas para el tratamiento doméstico de agua.

Tabla A.5

Técnica	Consideraciones
Métodos combinados (multibarrera): Algunos sistemas combinados se comercializan en forma de gránulos, polvos o comprimidos que contienen un coagulante químico, como una sal de hierro o aluminio, y un desinfectante, como el cloro.	➢ Si es apropiado para la técnica, podrá utilizarse la prueba por lotes. ➢ Las pruebas de exposición deberán realizarse en condiciones aceptables y representativas respecto del volumen de agua que se ha de tratar (pero al menos el mínimo de 20 L), la calidad del agua, el flujo (cuando se trate de un proceso de flujo continuo), la dosis y la duración del tratamiento (duración del tratamiento). ➢ Se deberán realizar la prueba con al menos tres valores de los parámetros de calidad del agua, representativos de las condiciones máxima, mínima y promedio de las aguas de los lugares en los que se utilizará la técnica. ➢ En el caso de los tratamientos combinados que incluyan un desinfectante químico, deberán medirse la dosis de desinfectante, la concentración residual de desinfectante en el agua tratada y el tiempo de contacto, y el desinfectante residual presente en el agua en el momento de la toma de muestras deberá neutralizarse químicamente antes de realizar los análisis microbiológicos.

Tabla A.6

Técnica	Consideraciones
Filtros de membrana o de medios porosos estructurados, tales como: • Filtros de tela o fibra. • Filtros de cerámica porosa (vela, olla). • Bloque poroso de carbón. • Filtros compuestos.	➢ Los filtros de cerámica y algunos otros filtros de medios porosos estructurados se limpian regularmente durante el uso doméstico. En la prueba los filtros se deberán limpiar siguiendo las recomendaciones del fabricante, en particular las relativas a la frecuencia y el método de limpieza. ➢ En la evaluación de estas técnicas de filtración no deberán aplicarse a los filtros durante su limpieza desinfectantes ni otros agentes antimicrobianos. Si se recomienda el uso de desinfectantes se deben incluir en la categoría de técnicas «multibarrera».
Filtros de medio granular: Están formados por lechos de relleno, capas o superficies, que contienen arena, tierra de diatomeas u otro medio constituido por partículas, sobre los que se vierte o por los que se hace pasar el agua.	➢ La mayoría de los filtros de medio granular han de someterse a retro lavado u otro tipo de limpieza periódica del filtro, por lo que durante la prueba deberán realizarse siguiendo las recomendaciones del fabricante. ➢ Se recomienda que la duración de la prueba para la evaluación de la técnica abarque al menos un lote de tratamiento del filtro, con una etapa de limpieza, por ejemplo mediante retro lavado o rastrillado y decantación de la superficie de la arena, y el periodo posterior de operación del filtro hasta el final de la operación o lote de tratamiento del filtro antes de la siguiente etapa de limpieza o mantenimiento. ➢ Los filtros de medio granular con actividad biológica, como los filtros lentos de arena de uso intermitente, pueden «madurar» con el tiempo, y la eficiencia de este tratamiento en la reducción de la carga de algunas bacterias puede no alcanzar su valor máximo u óptimo hasta que el filtro haya alcanzado su maduración biológica, en la prueba, la reducción de la carga bacteriana puede experimentar un aumento considerable después de un periodo de prueba mínimo de 14 días debido a que el filtro aún estaba madurando y no había alcanzado su estado de eficiencia máxima. Para este tipo de filtros, debe recopilarse información sobre la eficiencia de la técnica obtenida en pruebas periódicas realizadas durante un periodo prolongado de uso para representar mejor la capacidad de reducción de la carga bacteriana del filtro en el entorno previsto y cuando se indique o prevea habitualmente el uso durante periodos largos (por ejemplo, varios meses por ciclo de operación del filtro).

Tabla A.7

Técnica	Consideraciones
Técnicas de irradiación UV (con LED y otros tipos de lámparas), tales como: • Lámparas de UV • Lámparas de vapor de mercurio a presión baja que producen radiación UV monocromática a una λ Germicida de 254nm.	➢ Si el Proceso de tratamiento UV se realiza en un reactor de flujo continuo y el flujo puede variar en un intervalo especificado, las pruebas con agua inoculada se deberán realizar por duplicado, a los flujos promedio, máximo y mínimo, para documentar la variación de la eficacia germicida en todo el intervalo de flujos.

	➢ Deben seguirse las recomendaciones de uso del fabricante, en particular las relativas a las propiedades específicas de las lámparas, la potencia de entrada, el recipiente de tratamiento del agua, el reactor de tratamiento, la orientación de las lámparas con respecto al agua sometida a tratamiento, la intensidad de la radiación UV incidente (en mW / cm^2 u otras unidades pertinentes), la dosis estimada de UV administrada (fluencia, basada en la intensidad y el tiempo de exposición), en unidades Normalizadas (por ejemplo, en mJ / cm^2), y el flujo. ➢ Los adenovirus son más resistentes a la desinfección por radiación UV que cualquier otro virus substituto no patógeno conocido. ➢ El colífago substituto MS2 es relativamente resistente a la radiación UV y se puede utilizar para evaluar la Eficiencia de las técnicas de tratamiento doméstico de agua por desinfección mediante radiación UV.
Técnicas térmicas (basadas en el calentamiento): El calor se produce quemando combustible. El agua se hierve o se somete a condiciones de pasteurización (Normalmente > 63°C durante 30 minutos).	➢ Si el proceso es un reactor de flujo continuo, deberán seguirse las instrucciones del fabricante relativas a las condiciones de funcionamiento. ➢ En los procesos de tratamiento térmico, el agua tratada tarda cierto tiempo en alcanzar la temperatura objetivo y cierto tiempo en enfriarse hasta la temperatura de consumo. Por lo tanto, deberá registrarse la evolución de la temperatura del agua sometida a tratamiento, y los cambios de temperatura deberán compararse con los valores aceptables especificadas por el fabricante. ➢ La velocidad y el grado de inactivación microbiana dependen de las condiciones de tiempo y temperatura, de modo que es fundamental documentarlas en la evaluación de la eficiencia en reducción bacteriana. ➢ En la prueba se deberán utilizar condiciones de tiempo y temperatura consideradas aceptables de acuerdo con las especificaciones del fabricante y que además sean representativas de las condiciones en que se usará la técnica.

Tabla A.8

Técnica	Consideraciones
Desinfección química: • Yodo, oxidante fuerte en soluciones acuosas, comprimidos o resinas de polímeros sintéticos yodadas que liberan yodo activo lentamente (comprimidos de hidroperyoduro de tetraglicina que liberan yodo libre al agua). • Dióxido de cloro, así como de bromo, ozono u otros oxidantes. • Ácidos y bases fuertes. • Ferratos. • Metales antimicrobianos (plata y el cobre en forma soluble o coloidal, o partículas metálicas solidas más grandes).	➢ Se debe poner cuidado en preparar los cultivos concentrados de los microorganismos que se van a añadir de forma que no generen un exceso de demanda de cloro en el agua de prueba. ➢ Puede ser preciso purificar los cultivos microbianos para reducir su demanda de cloro (u otro desinfectante usado en la prueba) antes de añadirlos a las muestras en los estudios. ➢ Es especialmente importante medir el pH del agua de la prueba, así como las concentraciones de ciertos solutos, dado que la eficacia Germicida de algunos desinfectantes químicos, como el cloro libre y el dióxido de cloro, es distinta a pH bajo y a pH alto. La eficacia germicida del cloro libre es mayor si actúa en forma de ácido hipocloroso, predominante a pH bajo (≤ 6) que si actúa en forma de ion.

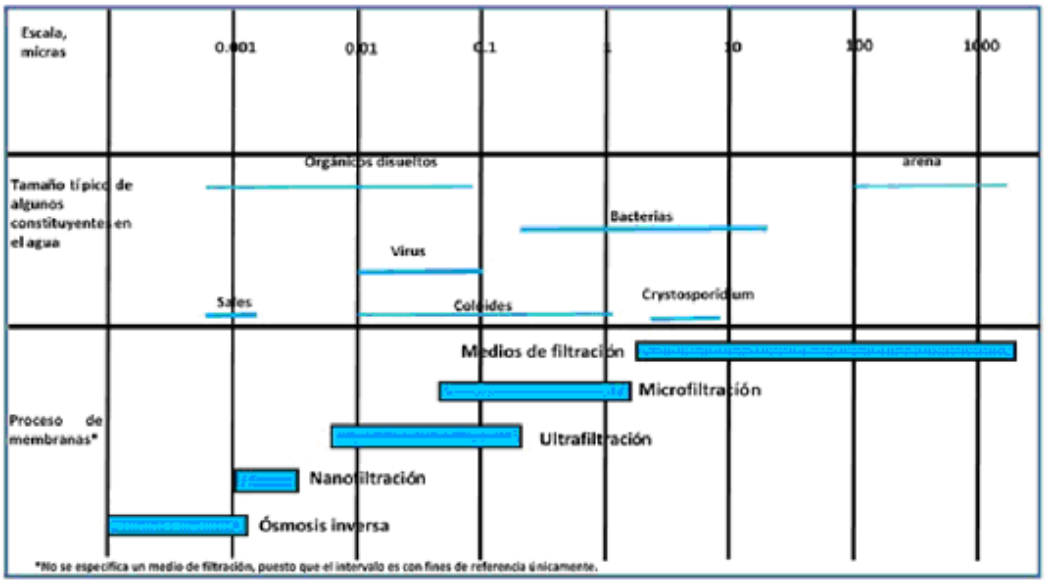
• Cloro y Cloro libre (ácido hipocloroso / hipoclorito en solución o comprimidos). • Oxidantes clorados (diclorocianuratos, tricloroisocianuratos, cloraminas).	Hipoclorito, predominante a valores de pH más altos (≥ 9). Por el contrario, el efecto viricida del dióxido de cloro es mayor a pH alto que a pH bajo. Además, los solutos que reaccionan con el cloro libre, como el amoniaco y los compuestos orgánicos, puede hacer que disminuya la concentración de cloro libre residual y reducir la actividad germicida. ➢ El efecto germicida de las cloraminas, que se forman por la reacción de cloro libre con amoniaco, es menor que la del cloro libre, y el efecto germicida de los compuestos orgánicos clorados resultantes de la reacción del cloro con la materia orgánica natural es nulo.
Coagulación-floculación y sedimentación: Algunos sistemas combinados se comercializan: en forma de gránulos, polvos o comprimidos que contienen un coagulante químico, como una sal de hierro o aluminio, y un desinfectante, como el cloro.	➢ Deberán tenerse en cuenta la dosis de coagulante (en su caso), las condiciones de mezclado (por ejemplo, el método de agitación) y el método especificado recomendado para eliminar los floculos del agua tratada (filtración física, sedimentación, decantación, etc.). ➢ La prueba se deberá realizar con los volúmenes de agua tratada especificados por el fabricante. Estos volúmenes se pueden basar en la unidad del tratamiento químico que se proporciona (por ejemplo, un comprimido o sobre). ➢ Para el funcionamiento eficaz de los procesos de coagulación-floculación pueden ser fundamentales las condiciones del mezclado (por ejemplo, la velocidad y la duración), así como la duración de la sedimentación posterior. Por consiguiente, la prueba se deberá realizar en las condiciones especificadas por el fabricante.

Para equipos con medios de filtración y en función del tamaño de partícula mostrada en la Figura A.5 de este Apéndice, el agua de prueba 1 o 2 no debería representar problema alguno en su operación o desempeño. Es importante puntualizar que el objetivo primario de esta Norma es la verificación y, de ser el caso, aprobación de equipos y tecnologías para la calidad microbiológica del agua suministrada para uso doméstico a nivel bacteriano o hasta parasitario; sin embargo, para la remoción de contaminantes específicos como virus o compuestos coloidales, orgánicos e inorgánicos disueltos y que no pueden ser removidos por sistemas de tratamiento convencionales que por lo regular son más económicos, existen las tecnologías denominadas como tecnologías de membranas.

Las tecnologías de membranas que incluye la micro, ultra y nanofiltración así como la ósmosis inversa, por lo general se emplean para flujos de suministro en localidades medias o grandes, como alternativa o complemento a un proceso de potabilización convencional en sistemas de abastecimiento públicos y privados, o cuando se presentan problemas de intrusión salina en acuíferos sobreexplotados, o cuando la única y factible fuente de agua es la procedente de los mares.

Las tecnologías de membranas son eficientes y por lo general de infraestructura menor o compacta, y aunque sus costos en los últimos 10 años se han reducido drásticamente, siguen siendo de alta inversión, de personal especializado y de infraestructura superior a los Procesos convencionales. Factores como la dureza y el pH tienen especial efecto en el desempeño de las tecnologías; asimismo el proceso de tratamiento del agua implica su posterior estabilización que le devuelve la concentración de SDT que la OMS en las Guías de Calidad del Agua edición 2014 http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf, establece en 600 mg/l como límite máximo permisible en el agua para uso y consumo humano, tal proceso de estabilización también incluye el ajuste de la alcalinidad y el pH, que se realiza con óxido de calcio y otros polímeros o químicos que no están o pueden no estar presentes naturalmente en los cuerpos de agua sometidos a tratamiento; por lo que pruebas de tratabilidad para cada tipo de agua deberán ser realizadas.

Figura A.5. Otra consideración especial está en función del tamaño de partícula del contaminante, lo que dependerá el paso de agua de prueba 1 o 2.



Long Term 1 Enhanced Surface Water Treatment Rule (LT1ESWTR) Disinfection Profiling and Benchmarking Technical Guidance Manual (PDF)

https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi?Dockey=20002649.txt

A.12.1 Otras técnicas

Para todas aquellas técnicas que sean creadas para el tratamiento doméstico de agua y que no se contemplan en esta Norma, debido al constante crecimiento en el desarrollo tecnológico e investigación, deberán realizar la prueba de eficiencia en reducción bacteriológica, para la protección de la salud pública.

A.13 Cálculos para la eficiencia en reducción bacteriana

Considerando la media aritmética de las muestras (duplicado para equipos y triplicado para sustancias germicidas) del agua de prueba inoculada sin tratar y agua tratada, se tiene:

A.13.1 El Porcentaje en Reducción Bacteriana de Mesófilos Aerobios (% RBMA) se calcula como sigue:

$$\%\ \mathbf{RBMA} = \frac{(\text{Mesófilos Aerobios })\text{APST} - \text{Mesófilos Aerobios })\text{APT}}{(\text{Mesófilos Aerobios })\text{APST}} \text{x}100$$

En donde:

APST: Agua de prueba inoculada sin tratar en UFC/ml.

APT: Agua de prueba tratada en UFC/ml.

A. 13.2 El Porcentaje en Reducción Bacteriana de Coliformes Totales (% RBCT) se calcula como sigue:

$$\%\ \mathbf{RBCT} = \frac{(\text{Coliformes totales})\text{APST} - (\text{Coliformes totales})\text{APT}}{(\text{Coliformes totales})\text{APST}} \text{x}100$$

En donde:

APST: Agua de prueba inoculada sin tratar en NMP/100 ml o UFC/ml.

APT: Agua de prueba tratada en NMP/100 ml o UFC/ml.

A.14. Resultados para la eficiencia en reducción bacteriana.

La prueba será aceptable para cada equipo o sustancia germicida, si la eficiencia en reducción bacteriana es de 95 % para Mesófilos aerobios y 99.99 % para coliformes totales en las aguas de prueba después del tratamiento.

A.15. Reporte.

A.15.1 El reporte de la eficiencia en reducción bacteriana emitido por el Tercero Autorizado debe contener la siguiente información:

A.15.1.1 Que indique que el equipo o sustancia sometida a prueba de eficiencia en reducción bacteriana se seleccionó en las instalaciones del usuario, por personal del laboratorio que realizó la prueba de eficiencia, presentar reporte de cadena de custodia;

A.15.1.2 Que indique específicamente la Norma utilizada para determinar la concentración de **(1).-** organismos Mesófilos aerobios, así mismo **(2).-** Norma utilizada para determinar la concentración bacterias coliformes totales;

A.15.1.3 Que indiquen el Nombre Comercial, número de Modelo, de acuerdo con el nombre señalado en la información técnica;

A.15.1.4 Que indique el Nombre, No. de Modelo, No. de serie de cada uno de los componentes que proporcionan tratamiento al agua del equipo al que se le practicó la prueba de eficiencia en reducción bacteriana;

A.15.1.5 Indicar que se utilizó como microorganismo de prueba la cepa Escherichia Coli ATCC 11229;

A.15.1.6 Incluir los resultados de la concentración de organismos Mesófilos aerobios y la concentración de organismos Coliformes totales, de las muestras de agua de prueba sin tratar y de las muestras de agua tratada;

A.15.1.7 Que la prueba de eficiencia en reducción bacteriana se realizó de acuerdo con el Proceso descrito en el Instructivo o Manual del usuario;

A.15.1.8 Infraestructura utilizada en el Proceso de evaluación de los equipos para tratamiento doméstico de agua, o sustancias germicidas, incluyendo evidencia fotográfica del banco de pruebas, y

A.15.1.9 Presentar Original de resultados.

A.15.2 El reporte de estudio de eficiencia en reducción de otros parámetros a reducir y/o eliminar por un equipo para tratamiento doméstico de agua y/o sustancia germicida emitido por el laboratorio seleccionado debe contener la siguiente información:

A.15.2.1 Introducción;

A.15.2.2 Objetivos;

A.15.2.3 Nombre de cada parámetro que reduce y/o elimina el equipo para tratamiento doméstico de agua y/o sustancia germicida;

A.15.2.4 La metodología (descripción del Proceso de evaluación de los equipos para tratamiento doméstico de agua), incluyendo un diagrama de flujo;

A.15.2.5 Concentración máxima de eliminación y/o remoción por cada parámetro manifestado en su escrito a las cuales se sometieron los equipos o sustancias para demostrar su eficiencia;

A.15.2.6 Etapas de L de agua tratada por los equipos, a las que se realizaran las pruebas de eficiencia en reducción de los parámetros en comento (0, 50, 75 y 100% de la Vida útil y los adicionales que requiera la persona física o moral);

A.15.2.7 Infraestructura utilizada en el Proceso de evaluación de los equipos para tratamiento doméstico de agua, o sustancias germicidas, incluyendo evidencia fotográfica del banco de pruebas;

A.15.2.8 Técnicas y métodos analíticos utilizados y su descripción;

A.15.2.9 Cronograma de actividades;

A.15.2.10 Incluir soporte técnico: límites de detección y cuantificación, cromatogramas y curvas de calibración, cuando aplique;

A.15.2.11 Incluir los resultados del análisis de los parámetros indicados en las Tablas A.3 y A.4, de esta Norma, realizados por el laboratorio Tercero Autorizado por COFEPRIS, correspondientes a las aguas de prueba 1 y 2;

A.15.2.12 Resultados del estudio firmados por la persona responsable del Laboratorio;

A.15.2.13 Conclusiones, y

A.15.2.14 Evidencia documental (copia del certificado) que indique que el Laboratorio seleccionado o institución pública o privada cuenta con un sistema de gestión de calidad ISO 17025 (Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y calibración (https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-2:v1:es) o Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 2006 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración (http://integra.cimav.edu.mx/intranet/data/files/calidad/documentos/externos/NMX-EC-17025-IMNC-2006.pdf) de buenas prácticas de laboratorio.

APÉNDICE B INFORMATIVO

Determinación de organismos coliformes totales y *Escherichia coli*. Método del sustrato cromogénico.

B.1 Introducción.

La determinación de organismos coliformes por medio del sustrato cromogénico, se fundamenta en el uso de sustratos cromogénicos hidrolizables para la detección de enzimas de bacterias coliformes. Cuando se utiliza esta técnica, el grupo se define como todas las bacterias que poseen la enzima ß-D-galactosidasa y son capaces de romper el sustrato cromogénico, dando como resultado una liberación del cromógeno. A diferencia del método de fermentación de lactosa que permite el crecimiento de muchos organismos aeróbicos y elimina o suprime algunos no coliformes con inhibidores químicos, esta técnica provee nutrientes que son más selectivos y específicos para el crecimiento de coliformes. La prueba puede usarse tanto en tubos múltiples como en formato presencia-ausencia (muestras individuales de 100 ml). La obtención de resultados válidos requiere la aplicación estricta de los procedimientos de control de calidad.

B.2 Principio.

El sustrato cromogénico tal como el orto-nitrofenil-ß-D galactopiranósido u otro equivalente, es empleado para detectar la enzima ß-D-galactosidasa, la cual es producida por bacterias coliformes totales. La enzima ß-D-galactosidasa hidroliza al sustrato y provoca un cambio de color, el cual indica y sustenta una prueba positiva después de 24 a 28 h sin procedimientos adicionales. Las bacterias no Coliformes, tales como las especies del género *Aeromonas y Pseudomonas*, que producen pequeñas cantidades de la enzima ß-D-galactosidasa, son suprimidas y no pueden producir una respuesta positiva durante las 28 h a menos de que más de $1X10^4$ UFC por ml estén presentes.

B.3 Aplicaciones.

La prueba de coliformes con sustrato cromogénico se recomienda para el análisis de muestras de agua potable, agua purificada o agua limpia proveniente de cualquier fuente.

Las muestras de agua que contienen materiales húmicos o de otro tipo pueden estar coloreadas. Si hay color de fondo, se comparan los tubos inoculados con un tubo de control conteniendo únicamente muestra de agua. Ciertas aguas con alto contenido de sales de calcio pueden causar precipitación, pero ésta no debe afectar la reacción.

La prueba del sustrato cromogénico no se usa para verificar siembras presuntivas de coliformes o colonias de filtración con membrana porque el sustrato puede ser sobrecargado por el inóculo pesado de ß-D-galactosidasa débil producido por no-coliformes, causando resultados falsos positivos.

En lo que se refiere a *Escherichia coli*, un sustrato fluorogénico como el 4-metilumbeliferil-ß-D-glucorónido es utilizado para detectar la enzima ß-glucoronidasa, la cual es producida por *E. coli*. La enzima ß-glucoronidasa hidroliza el sustrato, produciendo fluorescencia cuando el líquido es expuesto a la luz UV de onda larga (366 nm). La presencia de fluorescencia indica una respuesta positiva para *E. coli*. Algunas *Shigella spp* también pueden producir una respuesta positiva. Debido a que *Shigella spp* son reconocidas como patógenas humanas, no están consideradas como perjudiciales para probar la calidad sanitaria del agua.

B.4 Formulación del sustrato.

Las formulaciones del sustrato se presentan comercialmente en tubos para el procedimiento de tubos múltiples o en recipientes para muestras de 100 ml para la determinación de presencia/ausencia. También son aprovechables porciones pre-pesadas del reactivo para mezclar y dosificar en tubos múltiples para pruebas de 10 ml u otros recipientes para muestras de 100 ml. Se debe evitar la exposición prolongada del sustrato a la luz directa del sol.

La formulación en polvo contiene los siguientes compuestos anhidros (por L de sustrato preparado).

Sulfato de amonio $(NH_4)2SO_4$	5,00 g
Sulfato de manganeso, $MnSO_4$	0,0005 g
Sulfato de zinc, $ZnSO_4$	0,0005 g
Sulfato de magnesio, $MgSO_4$	0,10 g
Cloruro de sodio, NaCl	10,0 g
Cloruro de calcio, $CaCl_2$	0,05 g
Sulfito de sodio, Na_2SO_3	0,04 g
Amfotericina B	0,001 g
O-Nitrofenil-ß-D-galactopiranósido	0,50 g
4-Metilumbeliferil-ß-D-glucorónido	0,075 g
Solanio	0,50 g
Buffer Hepes de sal de sodio	5,3 g
Buffer Hepes de ac, orgánicos	6,9 g

B.5 Procedimiento.

B.5.1 Procedimiento de tubos múltiples. Seleccione el número apropiado de tubos por muestra con medio predosificado para la prueba de tubos múltiples y rotule. Siga las instrucciones del fabricante para preparar la serie de diluciones. Asépticamente, adicione 10 ml de muestra a cada tubo, tape herméticamente y agite vigorosamente para disolver. La mezcla resultante es incolora. Algunas partículas pueden resultar insolubles durante la prueba, esto no afectará su desarrollo.

El procedimiento también puede ser desarrollado con la adición de cantidades apropiadas del sustrato reactivo a la muestra, mezclando vigorosamente y dosificando en cinco o diez tubos estériles. Incube a 35± 0.5°C por 24 h.

B.5.2 Procedimiento de presencia/ausencia. Adicione asépticamente sustrato enzimático prepesado a 100 ml de muestra en un vaso, estéril, transparente, no fluorescente de borosilicato o en una botella o recipiente equivalente. Opcionalmente adicionar 100 ml. de muestra al sustrato enzimático en un recipiente provisto por el fabricante. Tape asépticamente y mezcle vigorosamente para disolver. Incube a 35+0,.5°C por 24 h.

B.6 Interpretación.

Después de 24 h de incubación examine si existe cambio de color en los tubos o recipientes. Cuando el sustrato es orto-nitrofenil-ß-D-galactopiranósido es hidrolizado por la enzima de la bacteria para producir ortonitrofenol amarillo; algunos sustratos usados en otras formulaciones pueden producir respuestas de diferente color. La respuesta cromogénica descrita es una reacción positiva para Coliformes totales. Si el cambio de color no es uniforme en todo el tubo, mezcle por inversión antes de la lectura. Comparar cada tubo nuevamente con el comparador de color disponible de la fuente comercial del sustrato. Si la intensidad del color es mayor o igual a la del comparador, los coliformes totales están presentes.

Las muestras son negativas para coliformes totales si no se observa color. Si la respuesta cromogénica es cuestionable después de 24 h, incube 4 h más. Si se intensifica el cromógeno, la muestra es positiva para coliformes totales; si no sucede esto, la muestra es negativa.

Incidir luz UV para la presencia de *E. coli*, la muestra será positiva si se observa fluorescencia en las celdas positivas para coliformes totales.

B.7 Reporte.

Si se desarrolló el procedimiento de NMP, calcular el valor de NMP del número de tubos o celdas positivos, de acuerdo con las tablas de NMP, correspondientes al sistema utilizado. Si se utiliza el procedimiento de presencia/ausencia, reportar resultados de coliformes totales presentes a ausentes en 100 ml de muestra.

B.8 Control de calidad.

Pruebe cada Lote de sustrato comercial desarrollando la prueba por inoculación con tres bacterias de control; *Escherichia coli*, otra Coliforme total diferente a *E. coli* (por ejemplo, *Enterobacter cloacae*)) y una no coliforme. Evite el uso de inóculos pesados. Si se usan *Pseudomonas* como el no coliforme representativo, seleccione una especie no fluorescente. Incube estos controles a 35 ± 0.5°C por 24 h. Lea y registre los resultados.

B.9 Bibliografía.

Edberg. S.C., M.J. Allen, D.B. Smith & the National Collaborative Study, 1988. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and Escherichia coli from drinking water: Comparison with the standard multiple tube fermentation method. Appl. Environ. Microbiol. 54:1595.

Edberg, S.C. & M.M. Edberg, 1988. A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. Yale J. Biol. Med. 61:389.

Covert, T.C., L.C. Shadix, E.W. Rice, J.R. Haines & R.W. Frey Berg, 1989. Evaluation of the autoanalysis Colilert test for detection and enumeration of total coliforms. Appl. Environ. Microbiol. 55:2443.

Edberg, S.C. & D.B. Smith, 1989. Absence of association between total heterotrophic and total coliform bacteria from a public water supply. Appl. Environ. Microbiol 55:380.

Edberg S.C., M.J. Allen, D.B. Smith & the National Collaborative Study, 1989. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and Escherichia coli from drinking water: Comparison with presence-absence techniques. Appl. Environ. Microbiol. 55:1003.

Edberg S.C., M.J. Allen, D.B. Smith & N.J. Kaiz, 1990. Enumeration of total coliforms and Escherichia coli from source water by the defined substrate technology. Appl. Environ. Microbiol. 56:366.

Edberg S.C., M.J. Allen, D.B. Smith, 1991. Defined substrate technology method for rapid and specific simultaneous enumeration of total coliforms and Escherichia coli from water: Collaborative study. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 74:526.

Edberg, S.C., F. Ludwig & D.B. Smith, 1991. The Colilert System for total coliforms and Escherichia coli. American Water Works Research Foundation, Denver, Co.

APÉNDICE C INFORMATIVO

Determinación de bacterias coliformes totales y coliformes fecales. Método de filtración por membrana.

C.1 Fundamento.

Este método se basa en la filtración de una muestra para concentrar células viables sobre la superficie de una membrana y transferirlas a un medio de cultivo apropiado, para posteriormente contar el número de UFC desarrolladas después de la incubación.

C.2 Material.

C.2.1 Autoclave con termómetro y manómetro, capaz de alcanzar temperatura de esterilización de 121 ± 2°C (a 15 psi), probado con termómetro y manómetro de máximas respectivamente;

C.2.2 Material para envolver esterilizable (papel kraft, bolsas de polímero resistentes al calor, otros);

C.2.3 Membranas para filtración, estériles, con poro de 0.45 milimicras y cojinetes absorbentes de 47 mm de diámetro;

C.2.4 Sistema de filtración;

C.2.5 Sistema de luz UV para esterilización de las unidades de filtración;

C.2.6 Bomba de vacío (20-27 pulgadas Hg), tubería y aditamentos herméticos para mantener el vacío;

C.2.7 Matraz Kitazato;

C.2.8 Cajas Petri desechables o de vidrio estériles de 50 x 90 mm;

C.2.9 Marcador indeleble o equivalente;

C.2.10 Pinzas de acero inoxidable;

C.2.11 Propipeta de 50 ml de capacidad;

C.2.12 Botellas de borosilicato con capacidad de 150 ml y tapa de rosca;

C.2.13 Pipetas serológicas de 1, 2, 5, 10 y 25 ml de capacidad, estériles y protegidas con tapón de algodón;

C.2.14 Utensilios estériles como: cucharas, cucharones, picahielos, destapadores, abrelatas, entre otros;

C.2.15 Microscopio estereoscópico, óptico o equivalente;

C.2.16 Incubadora de aire, con circulación mecánica, para operar a una temperatura de 35 ± 2°C;

C.2.17 Contador mecánico o manual de Tally;

C.2.18 Recipientes estériles para muestras (frascos, botellas, jarras, bolsas, otros);

C.2.19 Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g;

C.2.20 Porta asa y asa bacteriológica, y

C.2.21 Portaobjetos.

C.3 Reactivos y medios de cultivo.

C.3.1 Agar cuenta estándar.

Preparar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o por ingredientes:

C.3.1.1 El pH final debe ser de 7.0 ± 0.2 después de esterilizar a 121º C durante 15 minutos.

C.3.2 Agar ENDO LES.

C.3.2.1 Composición agar ENDO LES.

Ingredientes	Cantidad (g)
Extracto de levadura	1,2
Casitona o tripticasa	3,7
Tiopeptona o tiotona	3,7
Triptosa	7,5
Lactosa	9,4
Fosfato ácido de potasio - K_2HPO_4	3,3
Fosfato de potasio - K_3PO_4	1,0
Cloruro de sodio – NaCl	3,7
Desoxicolato de sodio	0,1
Lauril sulfato de sodio	0,05
Sulfito de sodio - Na_2SO_3	1,6
Fucsina básica	0,8
Agar	15,0
Agua grado reactivo	1000,0 ml

C.3.2.2 Preparación.

Rehidratar el medio en un L de agua que contenga 20 ml de etanol no desnaturalizado al 95%, (lo cual reduce el crecimiento y el tamaño de la colonia). Llevar hasta ebullición para disolver el agar, retirar del calor y enfriar a 45-50º C. No esterilizar en autoclave. El pH final debe ser 7,0 ± 0,2. Distribuir en cantidades de 5 a 7 ml en cajas de Petri de 60 mm de vidrio o plástico. Si se utilizan placas de otro tamaño, ajustar la cantidad de medio. No exponer las placas a la luz directa del sol. Almacenar en la oscuridad de 4 a 8ºC, preferiblemente en bolsas de plástico selladas u otros recipientes para reducir la pérdida de humedad. Descartar el medio que no se utilizó después de 2 semanas.

C.3.3 Medio ENDO.

C.3.3.1 Composición medio ENDO.

Ingredientes	Cantidad (g)
Triptosa o polipeptona	10,0
Tiopeptona o tiotona	5,0
Casitona o tripticasa	5,0
Extracto de levadura	1,5
Lactosa	12,5
Cloruro de sodio – NaCl	5,0
Fosfato ácido dipotásico - K_2HPO_4	4,375
Fosfato dihidrógeno potásico KH_2PO_4	1,375
Lauril sulfato de sodio	0,05
Desoxicolato de sodio	0,10
Sulfito de sodio - Na_2SO_3	2,1
Fuscina básica	1,05
Agar (opcional)	15,0
Agua grado reactivo	1000,0 ml

C.3.3.2 Rehidratar el medio en un L de agua que contenga 20 ml de etanol al 95 %. Calentar hasta ebullición para disolver el agar, retirar del calor y enfriar entre 45-50º C. Distribuir en cantidades de 5 a 7 ml a cajas de Petri desechables o de vidrio de 60 mm de diámetro. No esterilizar en autoclave. El pH final debe ser de 7.1-7.3.

C.3.3.3 Almacenar el medio (Caldo o Agar) en la oscuridad de 4 a 8º C y descarte cualquier caldo de medio sin usar después de 96 h y el agar sin usar después de 2 semanas.

C.3.3.4 Medio líquido: 2 ml por placa, sin agar; se puede usar un cojinete absorbente si está certificado, libre de sulfito u otro agente tóxico a una concentración que pueda inhibir el desarrollo bacteriano.

C.4 Procedimiento.

Generalmente, el enriquecimiento del medio de cultivo puede mejorar la valoración de la calidad del agua para beber. Sin embargo, este paso puede eliminarse en el análisis de rutina de este tipo de agua ya que varios estudios mostraron que se obtienen resultados adecuados por la técnica simple de filtración por membrana en un solo paso. Sin embargo, se recomienda que, en lo posible, se verifiquen todas las muestras de agua que den resultados positivos.

C.4.1 Selección del tamaño de muestra.

El tamaño de muestra lo determina la densidad bacteriana, lo cual en muestras de agua para beber estará limitado sólo por el grado de turbiedad o por el crecimiento de bacterias no coliformes sobre el medio. El volumen de muestra sugerida para prueba de coliformes totales y coliformes fecales por esta técnica es de 100 ml.

C.4.2 Filtración de la muestra.

Utilizando pinzas estériles, colocar una membrana estéril (cuadriculado hacia arriba) sobre el portafiltro poroso. Cuidadosamente coloque el embudo sobre el receptáculo y asegúrelo en su lugar. Filtre la muestra bajo vacío parcial, con el filtro aún en su lugar, enjuague el embudo mediante la filtración de tres porciones de 20 a 30 ml de solución buffer estéril. Una vez complementado el enjuague final y que el proceso de filtración haya concluido, quitar el embudo e inmediatamente después retire la membrana con pinzas estériles y colóquela sobre el medio selectivo con un movimiento circular a fin de evitar la entrada de aire. Meter un control de 100 ml de solución buffer estéril cada 10 muestras para estudiar una posible contaminación cruzada o buffer contaminado. Incubar el control bajo las mismas condiciones de la muestra.

Usar unidades de filtración estériles al principio de cada serie de filtraciones, como precaución mínima para prevenir contaminación accidental. Una serie de filtraciones se considera cuando hay un intervalo de interrupción de 30 minutos o más entre cada filtración de muestras. Después de tales interrupciones, tratar cualquier muestra como una serie de filtración y esterilizar toda la unidad de filtración en uso. Descontaminar este equipo entre filtraciones sucesivas, ya sea por medio de luz UV o esterilizando apropiadamente en autoclave de acuerdo con las características del equipo. No exponer la preparación de cultivo con el filtro de membrana al rango de radiación UV que pueda salir de la cabina de esterilización. Se recomienda protegerse los ojos, pueden usarse lentes de seguridad o de vidrio prescritos para la adecuada protección contra la luz UV de la columna de esterilización. Limpie el tubo de UV regularmente y cheque periódicamente su efectividad para asegurar que haya un 99,99% de muerte bacteriana en 2 minutos de exposición.

C.4.3 Técnica de enriquecimiento,

Colocar un cojinete absorbente en una caja de Petri estéril y pipetear 1.8 a 2.0 ml de caldo lauril triptosa para saturar el cojinete. Cuidadosamente remueva cualquier exceso de líquido del cojinete. Asépticamente colocar sobre el cojinete una membrana a través de la cual se haya filtrado una muestra de agua, incubar la membrana sin invertir la caja durante 15 a 20 h a 35 ± 0.5º C en una atmósfera de 90% de humedad relativa.

Si se usa el medio de agar base tipo ENDO, remover el enriquecimiento de la incubadora, separar la membrana del cojinete con el enriquecimiento y colocar sobre la superficie del agar. La colocación incorrecta de la membrana a su vez se pone de manifiesto, porque partes de la membrana no se tiñen, lo cual indica entrada de aire. Donde suceda esto, cuidadosamente vuelva a colocar la membrana sobre la superficie de agar. Si se usa medio líquido, colocar un cojinete estéril nuevo en el fondo de la caja y saturar con 1.8 a 2.0 ml de medio M-ENDO; separar la membrana del cojinete con el enriquecimiento y colocar sobre la superficie del M-ENDO, con las precauciones antes descritas. Descartar el cojinete de enriquecimiento utilizado.

A continuación, con el medio ya sea agar o líquido (con cojinete), invertir las placas e incubar de 20 a 22 h a 35 ± 0.5º C.

C.4.4 Técnica alternativa directa en paso simple,

Si se usa medio de agar base, colocar la membrana después de filtrar la muestra de agua, directamente sobre el agar como se describió anteriormente en el inciso C.4.3, de esta Norma e incubar durante 24 ± 2 h a 35 ± 0.5º C.

Si se usa medio líquido, colocar un cojinete sobre la placa y saturar con 1,8 a 2,0 ml de medio M-ENDO. Colocar la membrana después de filtrar la muestra de agua, directamente sobre el cojinete; invierta la caja e incube durante 24 ± 2 h a 35 ± 0.5º C.

C.4.5 Conteo: para determinar la cuenta de colonias sobre el filtro de membrana, usar un microscopio binocular de disección de bajo poder (10 a 15 aumentos) u otro aparato óptico similar, con lámpara fluorescente de luz blanca perpendicular, tanto como sea posible al plano del filtro.

Las colonias típicas de coliformes totales tienen color rojo oscuro con brillo metálico. El área brillante puede variar de tamaño, con brillo en la parte superior de la colonia o hasta cubrir su superficie total, las colonias atípicas de coliformes pueden ser rojo oscuro o nucleadas sin brillo. Las colonias que no tengan brillo pueden ser rosas, rojas, blancas o incoloras y se consideran no coliformes. No existe correlación entre la cuenta de colonias (coliformes o no coliformes) sobre el medio tipo ENDO y el número total de bacterias presentes en la muestra original. Sin embargo, una cuenta alta de bacterias no coliformes puede interferir con el máximo desarrollo de coliformes. La refrigeración de los cultivos (después de 22 h de incubación) con alta densidad de colonias no coliformes de 0,5 a 1 h antes de contar, puede prevenir la dispersión y puede ayudar a discernir el brillo metálico. La incubación anaeróbica a 35º C por 24 h de algunas muestras de agua subterránea, pueden suprimir el desarrollo de colonias de no coliformes, pero debe ser cuidadosamente evaluada para asegurar no perder la recuperación de los coliformes.

Las muestras de agua tratada, efluente o residual, puede incluir bacterias estresadas que crecen relativamente lento y producen un máximo brillo de 22 a 24 h. Los organismos de fuentes no tratadas pueden producir brillo de las 16 a 18 h y el brillo puede, subsecuentemente, disminuir después de 24 a 30 h.

C.4.6 Verificación de los coliformes,

Ocasionalmente, las colonias de no coliformes aparecen como colonias típicas con brillo. Las colonias atípicas (rojo oscuro, nucleadas sin brillo metálico) ocasionalmente pueden ser coliformes. Es recomendable verificar ambos tipos de colonias, mediante una prueba de fermentación de lactosa o por el uso de procedimientos alternativos, que involucren ambos una prueba rápida (4 h) o por reacciones bioquímicas típicas o un sistema multiprueba para especies.

C.4.6.1 Fermentación de la lactosa,

Verificar colonias típicas y atípicas incluidas en la cuenta directa; probar un mínimo de cinco de tales colonias, por transferencia del crecimiento de cada colonia en caldo lauril triptosa, incubar a 35 ± 0.5º C durante 48 h.

La formación de gas en caldo lauril triptosa y su confirmación en caldo lactosa con verde brillante dentro de las 48 h verifica a la colonia probada como coliforme.

C.4.6.2 Verificación alternativa de coliformes,

Aplicar este procedimiento alternativo de verificación de coliformes para colonias aisladas sobre el filtro de membrana. Si no hay colonias aisladas o si la separación entre las colonias es de menos de 2 mm, estriar el crecimiento a medio M-ENDO para asegurar la pureza del cultivo y transferir al tubo de fermentación.

C.4.6.2.1 Prueba rápida,

Una verificación rápida de las colonias es la prueba de citocromo oxidasa y beta- galactosidasa (ONPG). La reacción de los coliformes es de citocromo oxidasa negativa y ONPG positiva con 4 h de incubación del tubo de cultivo o procedimiento de microprueba.

C.4.6.2.2 Sistema multi-prueba comercial,

Verificar las colonias por estrías para su purificación, seleccionar colonias perfectamente aisladas e inocular dentro de un sistema multiprueba para enterobacterias que incluya reacciones de fermentación de lactosa, citocromo oxidasa y ONPG

C.5 Cálculos

Cálculo de la densidad de coliformes.

Hacer el conteo, usando filtros de membrana con 20 a 80 colonias de coliformes y no más de 200 colonias para cualquier tipo de colonia según la siguiente ecuación:

$$\frac{colonias\ de\ Coliformes\ totales}{100\ ml} = \frac{colonias\ de\ Coliformes\ contadas}{ml\ de\ muestra\ filtrados} x100$$

C.5.1 Agua para consumo humano, considerando las especificaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana citada en el inciso 3.4 Norma Oficial Mexicana (NOM-110-SSA1-1994) del Capítulo de Referencias normativas de esta Norma.

Con agua de buena calidad, la presencia general de coliformes es mínima. Por lo tanto, se deben contar todas las colonias de coliformes (cajas con 20 a 80 colonias) y usar la fórmula dada anteriormente para obtener la densidad de coliformes.

Si existe un crecimiento confluente, que es un desarrollo que cubre el área de filtración completa de la membrana o una porción y las colonias no están bien distribuidas, reportar los resultados como "crecimiento confluente con (sin) coliformes" y solicite un nuevo muestreo del mismo sitio. Si el número total de colonias bacterianas, coliformes o no coliformes excede las 200 por membrana o si las colonias no son suficientemente distinguibles una de la otra para asegurar el conteo, reporte los resultados como DNPC. La presencia de coliformes en tales cultivos, se verifica mediante la colocación del filtro de membrana completo dentro de un tubo estéril con caldo bilis verde brillante. Como alternativa arrastre la superficie completa del cultivo de la membrana con un asa estéril o con un hisopo de algodón estéril e inocule a un tubo de caldo lactosado y a otro de caldo bilis verde brillante.

Si se produce gas de este cultivo dentro de las 48 ± 3 h a 35 ± 0.5º C, se concluye la presencia de coliformes.

Se recomienda reportar "Crecimiento confluente" o "Demasiado numerosas para contar" con al menos una colonia de coliformes detectable (verificada) como una muestra positiva de coliforme total. No se recomienda reportar únicamente "Crecimiento confluente" o "Demasiado numerosas para contar".

Cuando no se detectan coliformes, habiendo utilizado volúmenes de muestra pequeños, se requiere una nueva muestra y seleccionar volúmenes más apropiados para la filtración por membrana. Normalmente se requieren volúmenes de 25, 50 o 100 ml para agua destinada al consumo humano.

Para reducir interferencia de sobrecrecimiento, en lugar de filtrar 100 ml, filtre porciones de 50 ml a través de dos diferentes membranas, porciones de 25 ml a través de cuatro diferentes membranas, y así sucesivamente. La cuenta de Coliformes totales observadas sobre todas las membranas se suma y se reporta el número total en 100 ml.

APÉNDICE D INFORMATIVO

Parámetros de riesgo y su evaluación para los materiales que se utilizan en la fabricación de equipos para tratamiento doméstico de agua

D.1 Introducción.

Los materiales utilizados para la fabricación de los equipos de tratamiento de agua tipo domestico durante su operación pueden migrar o añadir algún tipo de contaminante al agua que provoque daños a la salud de los usuarios.

D.2 Objetivo.

Este Apéndice Informativo, se emite con el objeto de establecer los parámetros de riesgo, que pueden evaluarse por un Laboratorio Tercero Autorizado, un acreditado por EMA o una institución reconocida a nivel nacional o internacional que cuente con un sistema de gestión de calidad ISO17025 (Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y calibración https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-2:v1:es) o Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006, como parte de los requisitos para obtener el CEB, descritos en el inciso 6.5, de esta Norma.

D.3 Parámetros a evaluar a los materiales que se utilizan en la fabricación de equipos de tratamiento de agua, tipo doméstico.

Los materiales que están en contacto con el agua para beber no deben contener niveles de contaminantes extraíbles que rebasen los límites permisibles establecidos en la Norma Oficial Mexicana citada en el inciso 3.6 (Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994) del Capítulo de Referencias normativas, de esta Norma, como se muestra en la Tabla D.1 de este Apéndice.

Tabla D.1

Analito	Límite de detección	Resultado		Límite NOM-127-SSA1-1994 (mg/L)
		Antes de filtro	Salida del filtro a las 24 h.	
Aluminio				0,2
Arsénico				0,025
Bario				0,70
Benceno				0,010
Cadmio				0,005
Cobre				2.0
Cromo total				0.05
Etilbenzeno				0,3
Hierro				0,30
Manganeso				0,15
Mercurio				0.001
Níquel				0,07
Plata				0,05

Analito	Límite de detección	Resultado		Límite NOM-127-SSA1-1994 (mg/L)
		Antes de filtro	Salida del filtro a las 24 h.	
Plomo				0,01
Tolueno				0,7
Xileno				0,5
Zinc				5,0

D.4 Métodos de Análisis.

Se realiza el estudio en base a la Norma NSF/ANSI 42, apartado 4.1, http://info.nsf.org/Certified/DWTU/ y a la Norma Brasil ABNT NBR 14908 (http://www.inmetro.gov.br/legislacao/rtac/pdf/RTAC001117.pdf)

D.4.1 Preparar un agua de prueba utilizando agua de abastecimiento público ajustada a las siguientes características:

Solidos Disueltos Totales de 100 $\pm$ 5 mg/L

Cloro Libre de 0.5 $\pm$ 1.0 mg/L

pH de 6.75 $\pm$ 0.25

Temperatura de 23 $\pm$ 2°C

D.4.1.1 Condiciones de ensayo.

El sistema y/o los componentes deberán ser instalados y acondicionados de acuerdo al manual de uso o instructivo.

D.4.1.2 Se toma y preserva una muestra de 2 L del agua de la red ajustada de acuerdo al procedimiento indicado en la Norma Oficial Mexicana citada en el inciso 3.9 (NOM-230-SSA1-2002) del Capítulo de Referencias normativas de esta Norma.

D.4.1.3 Se procede a llenar el sistema y/o los componentes, purgando el aire del equipo abriendo la válvula final, hasta quedar completamente lleno, dejar en estancamiento durante un periodo de 24 h.

D.4.1.4 Pasadas las 24 h se toma una muestra de agua de 2 L después del filtro, conforme al procedimiento indicado en la Norma Oficial Mexicana citada en el inciso 3.9 (NOM-230-SSA1-2002) del Capítulo de Referencias normativas de esta Norma.

D.4.1.5 La muestra deberá ser analizada por duplicado, esto sirve como estándar de control de la medición.

En caso de que en las dos muestras analizadas alguna de ellas rebase algún límite establecido en la Norma Oficial Mexicana citada en el inciso 3.6 (Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994) del Capítulo de Referencias normativas de esta Norma, se repetirá el análisis por duplicado para confirmar los resultados y reportarlo en el informe.

D.4.2 Análisis

El Análisis deberá ser realizado por un Tercero Autorizado que tenga acreditado practicar los métodos de prueba para realizar las determinaciones de los parámetros indicados en la Tabla D.1 de este Apéndice, utilizando los métodos expresados en la Tabla D.2 de este Apéndice o algún otro método normalizado validado por la autoridad sanitaria o por la EMA.

Tabla D.2 Métodos de prueba para la determinación de metales.

Analito	Método
Aluminio	NMX-AA-051-SCFI-2001
Arsénico	NOM-117-SSA1-1994
Cadmio	NOM-117-SSA1-1994
Cobre	NOM-117-SSA1-1994
Cromo total	NMX-AA-051-SCFI-2001
Hierro	NOM-117-SSA1-1994
Manganeso	NMX-AA-051-SCFI-2001
Mercurio	NOM-117-SSA1-1994
Plomo	NOM-117-SSA1-1994
Zinc	NOM-117-SSA1-1994

Nota: Para la determinación de los analitos, se pueden utilizar otros métodos analíticos siempre y cuando estén aprobados por la COFEPRIS o por la EMA.

D.4.2.1 Criterios de aceptación.

Los resultados de todas las muestras no deberán sobrepasar el límite establecido en la Norma Oficial Mexicana citada en el inciso 3.6 (Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994) del Capítulo de Referencias normativas de esta Norma, indicado para cada parámetro en la Tabla D.1, de este Apéndice.

D.4.2.2 Informe

El informe debe contener:

D.4.2.2.1 Objetivo;

D.4.2.2.2 Datos Generales del equipo evaluado incluyendo:

D.4.2.2.2.1 Nombre completo y No. de Modelo del equipo;

D.4.2.2.2.2 Nombre completo, No. de Modelo y de Serie de los Componentes que dan tratamiento al agua, que contiene el equipo, al practicársele la prueba;

D.4.2.2.2.3 Procedimiento de Ensayo;

D.4.2.2.2.4 Metodologías utilizadas para análisis de Metales;

D.4.2.2.2.5 Tabla de resultados con los Límites de Detección y Cuantificación de los métodos utilizados, y

D.4.2.2.2.6 Conclusión de cumplimiento con base en los límites establecidos en la Norma Oficial Mexicana citada en el inciso 3.6. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 del Capítulo de Referencias normativas de esta Norma.

5 Bibliografía

Norma Brasileña ABNT NBR Aparato para la mejora de la calidad del agua para uso Aparatos a presión - interno

NSF/ANSI STANDARDS 42 NSF/ANSI 42: DRINKING WATER TREATMENT UNITS – AESTHETIC EFFECTS

NMX-AA-051-SCFI-2001 Análisis de agua-Determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas - método de prueba.

Norma Oficial Mexicana NOM-117-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.

APÉNDICE E INFORMATIVO

Criterios para determinar la estabilidad de las sustancias germicidas.

Este Apéndice Informativo, se emite con el objeto de establecer los criterios que pueden efectuarse para determinar la caducidad de las sustancias germicidas que se comercialicen en México.

E.1 Introducción.

El objetivo de los estudios de estabilidad es proporcionar evidencia documentada de cómo los ingredientes que conforman a las sustancias germicidas como productos desinfectantes de uso sanitario y doméstico, varía con el tiempo, bajo la influencia de factores ambientales como: temperatura, humedad y luz. Los estudios permiten establecer las condiciones de almacenamiento, periodos de reanálisis y vida útil.

Es responsabilidad del fabricante, como parte del desarrollo de un producto desinfectante practicar estudios de estabilidad adecuados, considerando su formulación y envase, que permitan obtener información que demuestre la calidad del producto, durante el tiempo y bajo la influencia de las condiciones de almacenamiento a que es sometido.

E.2 Factores que deben considerarse cuando se determina la vida útil de un producto germicida.

Los factores más importantes que pueden influir en el grado y velocidad de deterioro de los productos desinfectantes son:

E.2.1 Factores ambientales: tales como temperatura, humedad, luz y oxígeno.

E.2.2. Factores relativos al producto, que pueden incluir:

E.2.2.1 Propiedades físicas y químicas del principio activo;

E.2.2.2 Propiedades físicas y químicas de los componentes complementarios, y

E.2.2.3 Presencia de ciertas impurezas como por ejemplo, sales o metales que puedan formar compuestos que afecten la calidad del producto.

E.2.3 Factores relativos a la formulación y su composición:

E.2.3.1 Proceso de fabricación, incluyendo las condiciones ambientales, los procedimientos tecnológicos y otros, como personal capacitado y los equipos, y

E.2.3.2 Cambios de materias primas, incluyendo la pureza de éstas.

E. 2.4 Factores relativos al envase:

E. 2.4.1 El material del envase con el cual el producto desinfectante tiene contacto directo, y

E. 2.4.2 El tipo de tapa del envase debe ser el adecuado para los distintos tipos de productos.

E.3 Diseño y protocolo.

Antes de comenzar los estudios se debe recolectar y analizar información relativa a la estabilidad intrínseca del o los principios activos y de acuerdo a esto será el diseño y protocolo a elegir. Para obtener resultados acordes a lo esperado, es importante elegir las condiciones adecuadas, dependiendo de cada producto o formulación para los respectivos estudios.

E.3.1 Tipos de estudios según principio activo y/o tipo de formulación:

E.3.1.1 Para el caso de productos desinfectantes, cuyos principios activos sean inestables como: Hipoclorito de sodio o Ácido Peracético, se deberán presentar estudios de estabilidad a tiempo real o de estantería, o en su defecto el estudio de estabilidad acelerado a 30°C por 6 semanas para avalar un periodo de eficacia de 6 meses, que es el tiempo promedio de estabilidad de estos activos;

E.3.1.2 En el caso de Hipoclorito de sodio de uso directo, si se desea avalar un periodo de eficacia mayor a éste, debe presentar el estudio de estabilidad correspondiente al periodo solicitado, y además los estudios de eficacia del producto tanto al inicio como al final de dicho periodo. Lo anterior es para comprobar, que, aunque la concentración del principio activo está fuera de rango de las especificaciones de producto terminado, éste aún sigue siendo eficaz como desinfectante, y

E.3.1.3 Para productos desinfectantes que sean generados in situ, a partir de un precursor y activador, como por ejemplo el dióxido de cloro, se debe presentar el estudio de estabilidad a tiempo real o de estantería, tanto del precursor como del activador.

En el caso que éste requiera ser almacenado, por periodos cortos de tiempo, como máximo un mes, deberá presentar los estudios de estabilidad a tiempo real o de estantería del producto terminado y en su envase de almacenamiento.

E.3.2 Condiciones de almacenamiento:

A continuación se detallan las condiciones de almacenamiento para avalar distintos periodos de eficacia, según las siguientes metodologías señaladas en la Tabla E1 de la “Guía para la realización y presentación de estudios de estabilidad de productos desinfectantes de uso sanitario y doméstico”.

En caso de que el solicitante cuente con un estudio de estabilidad con otras condiciones de almacenamiento, éste debe ser igualmente presentado y serán parte de la evaluación del producto.

Tabla E.1 Metodologías de Estudio de Condiciones de Almacenamiento.

Estudio	Condición de almacenamiento	Periodo de vigencia que se desea avalar
Estabilidad a tiempo real o de estantería	25°C ± 2°C / 60% ± 5% (temperatura ambiente)	6, 12, 18, 24, 36 ó 48 meses
Estudio de Estabilidad acelerado parcializado (Metodología CIPAC MT 46.3)	40°C ± 2°C por 2 semanas 35°C ± 2°C por 3 semanas 30°C ± 2°C por 5 semanas	6 meses
Estudio de estabilidad acelerado parcializado (Metodología CIPAC MT 46.3)	45°C ± 2°C por 3 semanas 40°C ± 2°C por 4 semanas 35°C ± 2°C por 6 semanas 30°C ± 2°C por 9 semanas	12 meses
Estudio de Estabilidad acelerado parcializado (Metodología CIPAC MT 46.3)	45°C ± 2°C por 5 semanas 40°C ± 2°C por 6 semanas 35°C ± 2°C por 9 semanas 30°C ± 2°C por 14 semanas	18 meses
Estabilidad acelerada (Metodología CIPAC MT 46.3)	54°C ± 2 °C por 14 días 50°C ± 2 °C por 4 semanas 45°C ± 2 °C por 6 semanas 40°C ± 2 °C por 8 semanas 35°C ± 2 °C por 12 semanas 30°C ± 2 °C por 18 semanas 0°C ± 2 °C por 7 días sólo para formulaciones líquidas	24 meses
Mixto o combinado: (Estantería y acelerado)	• 12 meses en estantería: a 25°C ± 2°C / 60% ± 5% • Luego someter al producto a un estudio acelerado, según condiciones señaladas en Estabilidad Acelerada.	36 meses
Acelerado a tiempo prolongado.	A cualquier temperatura elegida, señalada en Estabilidad Acelerada (Metodología CIPAC MT 46.3), extendiendo el tiempo de exposición (almacenamiento), según el periodo que desee avalar.	36 Más de 24 meses, m 37 Máximo 48 meses

E.3.3 Envases:

El material del envase utilizado en el estudio de estabilidad acelerado o a tiempo real, debe ser el mismo con el que se comercializará el producto. Es recomendable realizar el estudio de estabilidad a tiempo real o de estantería en cada uno de los diferentes tipos de envases disponibles para un mismo producto. Cuando el envase tenga un tamaño tal que imposibilite realizar el estudio acelerado (ejemplo: sacos de 5 kilos, bidón de contenido superior a 5 L), sólo se permite el estudio de estabilidad a tiempo real, salvo que se utilice un envase del mismo material y calidad al comercial, pero de menor escala, el cual tiene por único fin la realización del estudio de estabilidad acelerado.

E.3.4 Elección del Lote:

El estudio de estabilidad debe ser realizado utilizando uno o más lotes del producto que se desea registrar.

E.3.5 Especificaciones y parámetros a evaluar:

Los parámetros a evaluar deben corresponder a aquellos declarados en las especificaciones de calidad de producto terminado.

Se deben considerar:

E.3.5.1 Parámetros químicos como: cuantificación del o los principios activos, es decir, resultado numérico del análisis, y

E.3.5.2 Parámetros físicos tales como color, olor, forma (cuando corresponda), densidad, pH, viscosidad, tamaño de partícula, entre otros, dependiendo del tipo de formulación.

E.3.6 Metodología analítica:

Se deben utilizar métodos Normalizados por un Tercero Autorizado por la COFEPRIS, por un laboratorio acreditado por EMA o institución pública o privada reconocida a nivel nacional o internacional mediante un sistema de gestión de calidad ISO 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y calibración (https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-2:v1:es) o Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 2006 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración (http://integra.cimav.edu.mx/intranet/data/files/calidad/documentos/externos/NMX-EC-17025-IMNC-2006.pdf) de buenas prácticas de laboratorio.

E.4 Desarrollo del estudio de estabilidad.

El estudio debe diseñarse de manera tal que de él se obtenga la información necesaria, para conocer el periodo de vigencia del producto.

En el estudio de estabilidad puede incluir los siguientes antecedentes:

E.4.1 Laboratorio que realiza el estudio:

E.4.1.1 Nombre del Laboratorio;

E.4.1.2 Fecha recepción de la muestra;

E.4.1.3 Fecha de inicio del estudio de estabilidad;

E.4.1.4 Fecha de término del estudio de estabilidad, y

E.4.1.5 Nombre y firma del responsable a cargo.

E.4.2 Identificación del Producto:

E.4.2.1 Nombre comercial en la solicitud de registro,

E.4.2.2 Identificación de la fórmula presentada o al menos el principio activo y su concentración, y

E.4.2.3 Tipo de formulación.

E.4.3 Antecedentes de los lotes:

E.4.3.1 Lugar de fabricación;

E.4.3.2 Fecha de fabricación;

E.4.3.3 Número de Lote, y

E.4.3.4 Material de envase.

E.4.4 Condiciones del estudio:

E.4.4.1 Tipo de estudio (a tiempo real o acelerado);

E.4.4.2 Tiempo y margen de tolerancia;

E.4.4.3 Temperatura y margen de tolerancia;

E.4.4.4 Humedad y margen de tolerancia (dependiendo de las condiciones de almacenamiento utilizadas en cada tipo de estudio);

E.4.4.5 Luz (dependiendo de las condiciones de almacenamiento utilizadas en cada tipo de estudio);

E.4.4.6 Método analítico utilizado;

E.4.4.7 Resultados en Tabla, indicando la valoración del o los activos de forma numérica, y

E.4.4.8 Conclusión y periodo de eficacia propuesto, el cual debe ser acorde a los resultados.

E.4.5 Características a evaluar:

E.4.5.1 Físicas: Aspecto tales como color, olor, forma, densidad, pH, viscosidad, tamaño de partícula, entre otros, cuando correspondan.

E.4.5.2 Químicas: Valoración o cuantificación del o los principios activos.

E.4.5.3 Envase: Se debe realizar un análisis visual del envase, de acuerdo a las características de éste, como son color, forma, dureza, etc.

E.4.6 Frecuencia de Análisis:

La frecuencia de muestreo y análisis debe permitir establecer el comportamiento de la estabilidad durante el periodo de eficacia propuesto.

E.4.6.1 Para un estudio de estabilidad a tiempo real, es suficiente una frecuencia de muestreo y análisis a los 0, 3, 6 y 12 meses durante el primer año, cada 6 meses durante el segundo año y una vez al año, a partir del tercer año.

E.4.6.2 Para un estudio de estabilidad acelerado, es aceptable un mínimo de 3 meses, incluidos los efectuados a tiempo inicial, final y por lo menos una evaluación intermedia, a excepción de la condición de almacenamiento acelerado a 54°C por 14 días, en que se aceptará las determinaciones inicial y final del estudio.

E.5 Interpretación de resultados.

Los resultados obtenidos de los análisis realizados a los productos deben ser:

E.5.1 Análisis físicos:

Estos deben cumplir los parámetros señalados, según lo declarado por el solicitante; por ejemplo: el aspecto de un producto debe mantener sus características originales como color, olor o forma hasta el final del periodo de prueba, de lo contrario, si el producto pierde sus propiedades originales, este no cumplirá con este parámetro, afectando la calidad del producto. La pérdida de propiedades físicas como cambios en el color, olor, forma o turbidez de un producto pueden ser indicadores de descomposición del producto.

E.5.2 Análisis químicos:

Estos deben cumplir los parámetros señalados, según lo declarado por el solicitante. Las valoraciones del activo o activos, deben encontrarse dentro de un rango de ± 10% del valor teórico declarado, a excepción de que se haya declarado, otro rango de aceptación, el cual no debe superar a un 20% del valor teórico. Si los resultados de dichas valoraciones se escapan de los rangos establecidos, igualmente deben ser informados, para poder establecer el momento en que el producto comienza a ser inestable y/o a perder sus propiedades químicas.

E.5.3 Análisis del envase:

Estos deben cumplir los parámetros, según lo declarado por el solicitante; ya que la pérdida de propiedades como por ejemplo, dureza del material o fatiga de éste o de las tapas, influirá en la calidad del producto e incluso puede causar la descomposición de éste, o el derrame del producto, para el caso de los líquidos.

De los tres incisos anteriores, se puede concluir sobre la estabilidad del producto y por tanto del periodo de eficacia de éste.

Si alguno de estos incisos no cumple, quiere decir que tal vez no se eligieron las condiciones adecuadas para el estudio, o que el material del envase o las tapas de éste no son adecuadas para el tipo de producto, o simplemente que el producto es inestable y no puede ser sometido a altas temperaturas, en el caso de estudios acelerados. Por ello es importante como se señaló en inciso E.3 (Diseño y protocolo) de esta Norma, elegir las condiciones adecuadas para el estudio, dependiendo de la naturaleza de cada producto.

E.6 Bibliografía

Ministerio de Salud, Instituto de Salud Pública de Chile, “Guía para la realización y presentación de estudios de estabilidad de productos desinfectantes de uso sanitario y doméstico” Disponible en http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2018/05/Guia%20Estabilidad%20de%20productos%20Desinfectantes%20v.1.pdf

APENDICE F INFORMATIVO

Método para la determinación de colifagos.

F.1 Introducción.

Más de 140 virus patógenos pueden ser transmitidos al hombre a través del agua. Estos son los virus entéricos eliminados a través de las heces de personas infectadas. Los más comunes son los virus causantes de gastroenteritis y el virus de la hepatitis. Algunos de estos virus (rotavirus, virus Norwalk) no generan memoria inmune por lo que la infección puede repetirse varias veces a lo largo de la vida.

F.1.1 Se han propuesto dos tipos de fagos: colifagos somáticos y colifagos F específicos. Los argumentos que validan la propuesta son:

F.1.1.1 Los fagos se encuentran abundantemente en agua residual y agua contaminada;

F.1.1.2 Las poblaciones de colifagos son mucho más grandes que las de los enterovirus;

F.1.1.3 Los colifagos son incapaces de replicarse fuera del huésped bacteriano;

F.1.1.4 Los colifagos se pueden aislar y contar usando métodos sencillos;

F.1.1.5 Se obtienen resultados más rápidos cuando se analizan los colifagos que cuando se trabaja con enterovirus, y

F.1.1.6 Ciertos colifagos son tan resistentes como los enterovirus a los procesos de desinfección.

F.1.2 La Organización Mundial de la Salud 2014 [WHO International Scheme to Evaluate Household Water Treatment Technologies. Harmonized Testing Protocol: Technology Non-Specific. Geneva, Switzerland, http://www.who.int/household_water/scheme/HarmonizedTestProtocol.pdf], propone dos métodos de determinación de colifagos, sin que sea limitativo, para la evaluación del desempeño de equipos o sustancias que eliminan virus:

F.1.2.1 Método descrito en el Anexo A, Sección A.8.2.2 of NSF/ANSI 55: Ultraviolet Microbiological Water Treatment Systems (2012) http://www.nsf.org/newsroom/nsf-ansi-55-ultraviolet-microbiological-water-treatment-systems; ó

F.1.2.2 Método NEN-EN-ISO 10705-1 (Detection and enumeration of bacteriophages Part 2: Enumeration of somatic coliphages). https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10705:-1:ed-1:v1:en

F.1.3 Los análisis se realizarán por triplicado; la media geométrica y la desviación estándar para cada tipo agua, los cuales deben ser reportados.

F.1.4 Las muestras serán procesadas dentro de las primeras ocho h, después de la colecta.

F.1.5 El volumen de muestra colectado deberá ser el suficiente para su procesamiento por triplicado y retener un volumen de 12 ml.

F.2 Resumen.

Los colifagos MS-2 y *Escherichia coli* son usados como surrogados, para determinar el desempeño de sistemas para tratamiento de agua a nivel intradomiciliario, en la eliminación o inactivación de virus. Se describe uno de los métodos más utilizados para la preparación de la suspensión, titulación y análisis de organismos de reto.

Uno de los métodos más utilizados, confiables y sencillos es el que se describe a continuación, publicado en el Anexo A, Sección A.8.2.2 del NSF/ANSI 55: Ultraviolet Microbiological Water Treatment Systems (2012). http://www.nsf.org/newsroom/nsf-ansi-55-ultraviolet-microbiological-water-treatment-systems

F.3 Equipo.

F.3.1 Autoclave;

F.3.2 Incubadora, 35 ± 1°C;

F.3.3 Refrigerador, 5 ± 3°C;

F.3.4 Baño de agua 50 ± 1°C;

F.3.5 Congelador;

F.3.6 Horno de microondas;

F.3.7 Vortex;

F.3.8 Espectrofotómetro UV-Visible;

F.3.9 pH metro;

F.3.10 Hematocitómetro;

F.3.11 Contador de colonias, y

F.3.12 Centrífuga

F.4 Microorganismos.

Es deseable que las cepas para prueba se obtengan de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés), 19301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776.

Colifagos MS-2.- Coliphage (ATCC # 15597-Bl); y *Escherichia coli* cepa hospedera (ATCC # 15597).

F.5 Material.

F.5.1 Cajas Petri estériles, 20x60 mm y 15x100 mm;

F.5.2 Pipetas estériles, 1 ml y 10 ml;

F.5.3 Tubos de centrífuga estériles, 10 ml y 50 ml;

F.5.4 Botellas de tapón de rosca estériles para muestra, 125 ml;

F.5.5 Tubos de ensaye estériles, 16x125 mm;

F.5.6 Asas estériles para inoculación;

F.5.7 Equipos para filtración por membrana, estériles;

F.5.8 Membranas filtrantes de policarbonato estériles de 0.22 µm;

F.5.9 Filtro Whatman # 1;

F.5.10 Kit para determinación de cloro, y

F.5.11 Envase estéril de polipropileno desechable.

F.6 Reactivos.

F.6.1 Agua buffer estéril de dilución.

F.6.1.1 Solución concentrada del buffer de fosfato.

Disolver 34 g de KH_2PO_4 en 500 ml de agua destilada. Ajustar el pH de la solución concentrada a 7.2 con NaOH 1 N.

F.6.1.2 Solución de cloruro de magnesio.

Disolver 38 g de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) en 1 L de agua destilada.

F.6.1.3 Preparación del agua de dilución buffer estéril.

Agregar 1,25 ml de solución concentrada del buffer de fosfato y 5 ml de la solución de cloruro de magnesio y diluir a 1 L con agua destilada.

F.6.2 Buffer de fosfato salino (PBS).

F.6.2.1 Preparar una solución concentrada, disolviendo 80 g de NaCl, 2 g de KH_2PO_4, 24 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ y 2 g de KCl, en un volumen final de 1 L.

F.6.2.2 Preparar una solución de trabajo, diluyendo 1 volumen de solución concentrada por 9 volúmenes de agua. Ajustar el pH a 7.4 unidades de pH con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N, antes de su uso.

F.6.3 Ácido etilendiaminotretracético (EDTA).

F.6.4 Lisozima, Boehringer Mannheim, #1 243004. Conservar en refrigeración entre 2 y 8 °C.

F.7 Medios de cultivo.

F.7.1 Medios de cultivos comerciales.

Preparar de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Deberá monitorearse la calidad del medio de crecimiento examinando la promoción de crecimiento y esterilidad antes de su uso.

F.7.2 Medio ATCC #271 para *Escherichia coli.*

F.7.2.1 Solución A

F.7.2.1.1 Triptona	10 g
F.7.2.1.2 Extracto de levadura	1.0 g
F.7.2.1.3 Cloruro de sodio	8.0 g
F.7.2.1.4 Cloruro de sodio	0.5 g
F.7.2.1.5 Agar (si se requiere)	15 g
F.7.2.1.6 Agua desionizada	950 ml

F.7.2.2 Esterilizar en autoclave a 121°C.

Asépticamente agregar lo siguiente:

Solución B

F.7.2.2.1 Glucosa	1.0 g
F.7.2.2.2 Cloruro de calcio	0.294 g
F.7.2.2.3 Tiamina	10.0 mg
F.7.2.2.4 Agua desionizada	50 ml

F.7.3 Esterilizar mediante filtración y agregar asépticamente al medio estéril.

F.7.3.1 TSB (caldo soya triptona).

F.7.3.1.1 Triptona	1.7 g
F.7.3.1.2 Soytona	0.3 g
F.7.3.1.3 Dextrosa	0.25 g
F.7.3.1.4 Cloruro de sodio	0.5 g
F.7.3.1.5 Fosfato dipotásico	0.25 g
F.7.3.1.6 Agua desionizada	100 ml
F.7.3.1.7 pH	7.3 ± 0.2

Disolver por ebullición, ajustar el pH al final y distribuir alícuotas de 8 ml en tubos de ensaye de 16 x 150 mm. Esterilizar en autoclave a 121°C ± 1°C a 15 psi por 20 minutos. Almacenar el caldo fío a 5 ± 3°C.

F.7.4 TSA 1.5% (Agar soya triptona).

F.7.4.1 Triptona	7.5 g
F.7.4.2 Soytona	2.5 g
F.7.4.3 Cloruro de sodio	7.5 g
F.7.4.4 Bacto-agar	7.5 g
F.7.4.5 Agua desionizada	500 ml
F.7.4.6 pH	7.3 ± 0.2

Disolver mediante ebullición, ajustar el pH y esterilizar en autoclave a 121°C ± 1°C a 15 psi por 20 minutos. Verter el medio temperado en cajas Petri estériles. Almacenar las placas de agar a 5 ± 3°C. Antes de usar, temperar las placas a temperatura ambiente.

F.7.5 TSA 1% agar para cubrir fagos.

F.7.5.1 Triptona	7.5 g
F.7.5.2 Soytona	2.5 g
F.7.5.3 Cloruro de sodio	7.5 g
F.7.5.4 Agar	5 g

F.7.5.5 Agua desionizada 500 ml

F.7.5.6 pH 7.3 ± 0.2

Disolver mediante ebullición, ajustar el pH y esterilizar en autoclave a 121°C ± 1°C a 15 psi por 20 minutos. Almacenar el agar a 5 ± 3 °C. El día de la prueba, licuar y colocar en el baño de agua a 45 ± 1°C. Es muy importante conservar el agar para cubrir los Colifagos MS-2 a esta temperatura para evitar la solidificación del agar.

F.8 Cultivo de los organismos de reto.

F.8.1 Propagación de Colifagos MS-2 y de *Escherichia coli.*

Esta sección describe los métodos de propagación y cosecha para las suspensiones concentradas de Colifagos MS-2 para su uso como reto.

F.8.1.1 Propagación de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 15597.

F.8.1.1.1 Cepa liofilizada.

F.8.1.1.2 Abrir el vial de acuerdo con las instrucciones incluidas en el paquete.

F.8.1.1.3 Usando un tubo de caldo #271 (5 a 6 ml), retirar aproximadamente 0.5 a 1.0 ml con una pipeta. Rehidratar el pellet.

F.8.1.1.4 Asépticamente, transferir este pellet rehidratado en el tubo de caldo. Mezclar perfectamente.

F.8.1.1.5 Usar algunas gotas de la suspensión para inocular un tubo con medio sólido #271 inclinado y/o en placa.

F.8.1.1.6 Incubar los tubos y placas a 37°C por 24 horas.

F.8.1.1.7 Las colonias de *E. coli* en placas de medio #271, son circulares, enteras, brillantes, poco convexas, crema y translúcidas. Esta cepa crecerá en cualquier medio estándar. El medio descrito es el recomendado para la propagación de fagos. La temperatura de conservación criogénicamente congelada es de 80°C y de 2°C a 8°C si está liofilizada.

F.8.1.1.8 Si la cepa se adquirió en micro-crioviales de glicerol congelado, no es necesario rehidratar.

F.8.1.1.9 Descongelar en baño de agua a 25-30°C con agitación suave; en aproximadamente 3 minutos se habrán fundido los cristales de hielo.

F.8.1.1.10 Inmediatamente después de la descongelación, limpiar el microvial con etanol al 70% y asépticamente transferir el contenido completo a un tubo de 5-6 ml de caldo #271 o directamente inocular en placa o tubo inclinado conteniendo medio sólido #271.

F.8.1.1.11 Desechar el microvial vacío. No congelar las porciones que no se hayan utilizado, ya que la cepa perdería viabilidad.

F.8.1.1.12 Incubar a 37°C por 24 h.

F.8.1.1.13 Los microviales congelados en hielo seco, deben descongelarse inmediatamente antes de su uso o almacenar $\leq$ 70°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. El almacenamiento de corto plazo a -20°C es aceptable hasta por 3 meses.

F.8.1.2 Preparación de la suspensión de Colifagos MS-2.

F.8.1.2.1 Usar ATCC® 15597™ *Escherichia coli* cepa C3000 como bacteria hospedera.

F.8.1.2.2 Para recuperar los fagos liofilizados o congelados del vial:

F.8.1.2.2.1 En medio líquido, preparar un cultivo en crecimiento activo de la bacteria hospedera antes de abrir el microvial con los fagos. El cultivo será de 6 h de edad. Evitar hacer pases repetidos del hospedero;

F.8.1.2.2.2 Agregar aproximadamente 1.0 ml del caldo #271 a un vial de fagos liofilizados, o 0.5 ml a un criovial líquido;

F.8.1.2.2.3 Precalentar las cajas del medio sólido #271 en una incubadora. Cubrir la superficie con 2.5 ml de agar al 0.5% licuado (el mismo medio), el cual contiene una gota del cultivo de 6 h de la bacteria hospedera. Se mantendrá el agar suave entre 43°C y 45°C listo para verter. Puede ser conveniente usar un baño de agua. Permitir que solidifique, y

F.8.1.2.2.4 Los fagos rehidratados pueden ser diluidos serialmente, pasando 0.5 ml de los fagos en tubos con 4.5 ml de medio #271 líquido. Repetir tantas veces como sea necesario.

F.8.2 Preparación de la suspensión concentrada de colifagos.

F.8.2.1 Un día antes de preparar la suspensión concentrada de Colifagos MS-2, descongelar la cepa hospedera de *E. coli* criogénicamente congelada (e inocular un tubo de TSB con 0.1 ml de la suspensión de Colifagos preparada en el inciso F.8.1.2, de esta Norma. Incubar a 35 ± 1°C por 18 ± 2 h.

F.8.2.2 El día de la preparación de la suspensión concentrada de Colifagos MS-2, licuar el TSA 1% y temperar el medio a 45 ± 1°C en baño de agua. Las cajas de TSA 1.5% también deberán estar a temperatura ambiente.

F.8.2.3 Hacer diluciones seriadas de la suspensión concentrada de Colifagos MS-2 (10^{-1} a 10^{-12}) usando PBS estéril. Inocular por triplicado, cajas de TSA 1.5% con diluciones 10^{-5} a 10^{12}. En un tubo estéril transferir 1 ml de Colifagos MS-2 diluidos, inmediatamente agregar 0.1 ml de la bacteria hospedera *E. coli* y 5 ml de TSA 1%. Homogenizar en el Vortex y verter. Mezclar para distribuir el inóculo uniformemente en la caja. Una vez que la capa del TSA 1% ha solidificado, invertir las placas e incubar a 35 ± 1°C por 18 ± 2 h.

F.8.2.4 Seleccionar las placas que presenten lisis completa de las células hospederas de los Colifagos. Inunde la superficie de cada caja con 3 ml de TSB y retirar cuidadosamente la capa de TSA 1% usando un instrumento adecuado para raspar las células. Verter el contenido en dos tubos estériles de 50 ml para centrífuga y llevar a un volumen total de 40 ml con TSB. Agregar 0.2 g de EDTA y 0.026 g de lisozima a cada tubo. Incubar a temperatura ambiente por 2 h, mezclando cada 15 minutos

F.8.2.5 Después de las dos h de incubación, centrifugar los tubos a 9280 xg por 5 minutos, o a 2320 xg por 20 minutos~~,~~ a 20 ± 1°C. Remover el sobrenadante resultante evitando el pellet. Asépticamente, armar el equipo de filtración en membrana, ensamblando la membrana de policarbonato estéril. Pre-tratar el filtro con 10 ml de caldo TSB justo antes de la filtración para minimizar la adsorción de Colifagos MS-2 al filtro. Filtrar el sobrenadante.

F.8.2. 6 Para periodos de almacenamiento superiores a 28 días, agregar 1/10 de volumen de glicerol estéril a la suspensión, distribuir en crioviales alícuotas de 1 ml y 3 ml.

F.8.2.7 Titular la suspensión de Colifagos MS-2 como se describe en el inciso 8.3. La concentración de colifagos deberá ser de 10^{10} a 10^{12} UFP/ml.

F.8.2.8 Los fagos se conservan a -80°C en congelación o entre 2 y 8°C si están liofilizados.

F.8.3 Enumeración de placas de MS-2-

F.8.3.1 Descongelar la cepa hospedera de *E. coli* criogénicamente congelada e inocular un tubo de TSB con 0.1 ml de la suspensión concentrada. Incubar a 35 ± 1°C por 18 ± 2 h.

F.8.3.2 Licuar el TSA 1% y temperar el medio a 45 ± 1°C en baño de agua. Las cajas de TSA 1.5% también deberán estar a temperatura ambiente.

F.8.3.3 Hacer diluciones seriadas de la suspensión concentrada de Colifagos MS-2 (10^{-1} a 10^{-12}) usando PBS estéril. Inocular por triplicado, cajas de TSA 1.5% con diluciones 10^{-7} a 10^{12}. En un tubo estéril transferir 1 ml de Colifagos MS-2 diluidos, inmediatamente agregar 0.1 ml de la bacteria hospedera *E. coli* y .5 m de TSA 1%. Homogenizar en el Vortex y verter. Mezclar para distribuir el inóculo uniformemente en la caja. Una vez que la capa del TSA 1% ha solidificado, invertir las placas e incubar a 35 ± 1°C por 18 ± 2 h.

F.8.3.4 Después de la incubación, cuantificar distintas cajas que contengan entre 25 y 250 UFP, usando un contador de colonias. Calcular el título de la suspensión de Colifagos MS-2 multiplicando el número de UFP obtenidos por el inverso del factor de dilución. Expresar los resultados como el número de UFP/ml. La concentración de colifagos deberá ser de 10^{10} a 10^{12} UFP/ml.

F.9 Análisis de las muestras del influente y efluente.

F.9.1 Hacer diluciones seriadas de las muestras del influente y efluente (10^{0} a 10^{5}) usando PBS estéril. Inocular por duplicado, las diluciones en cajas de TSA 1.5% y agregar inmediatamente 0.1 ml de la cepa de *E. coli* hospedera y 5 ml de agar TSA 1% fundido. Homogenizar y verter. Mezclar para distribuir el inóculo uniformemente en la caja. Una vez que la capa del TSA 1% ha solidificado, invertir las placas e incubar a 35 ± 1°C por 18 ± 2 h.

F.9.2 Después de la incubación, cuantificar distintas cajas que contengan entre 25 y 250 UFP, usando un contador de colonias. Calcular el título de Colifagos MS-2, multiplicando el número de UFP obtenidos por el inverso del factor de dilución. Expresar los resultados como el número de UFP/ml.

F.10 Otros detalles de la prueba.

F.10.1 Control no tratado.

El agua microbiológicamente inoculada que va a ser utilizada como la concentración de reto antes del tratamiento/influente, servirá también como el control no tratado.

F.10.2 Muestra blanco.

Antes de iniciar la prueba, el producto será probado con agua general de prueba sin inóculo, para verificar que el producto llegó al laboratorio libre de los organismos de reto. Para productos químicos, se adicionará el volumen apropiado para el tratamiento y muestreado para los organismos de reto. Asegurar siempre que se obtendrá el volumen de muestra necesario para el análisis de microorganismos.

E.10.3 Aseguramiento y control de calidad.

Los laboratorios de prueba se apegarán a los requerimientos de sus procedimientos de aseguramiento y control de calidad y deberán ser capaces de proporcionar la documentación de soporte, la cual incluirá al menos: verificación de la calidad de los stocks de organismos, instrumentos de calibración, controles ambientales durante el desarrollo de la prueba, entre otros.

E.10.4 Producto residual.

Para productos que emplean un desinfectante, deberá verificarse la neutralización del residual para las aguas de prueba. El control no tratado se destinará a aspectos de toxicidad del neutralizante. Los métodos de neutralización más frecuentemente utilizados son los siguientes:

Tabla F.1

Desinfectante	Neutralizante del residual
Cloro y sus compuestos	Tiosulfato de sodio
Iodo	Tiosulfato de sodio
Plata	Tiosulfato de sodio y tioglicolato de sodio
Cobre	Tiosulfato de sodio y tioglicolato de sodio con adición de lecitina y Tween

F.11 Precauciones y seguridad.

F.11.1 La manipulación de muestras esterilizadas y equipo deben ser manipuladas con guantes protectores del calor antes de ser retiradas de la autoclave.

F.11.2 Los viales de cultivos criogénicos, se manipulan con guantes crioprotectores.

F.11.3 Todas las muestras microbiológicas, así como los materiales contaminados durante el ensayo, se esterilizan en autoclave a 121 ± 1°C a 15 psi por un tiempo mínimo de 20 minutos, antes de ser desechados.

F.12 Bibliografía.

American Type Culture Collection. Producto Sheet. *Escherichia coli* (ATCC® 15597) C-3000. *Escherichia coli* (Migula) Castellani y Chalmers.

American Type Culture Collection. Producto Sheet. *Escherichia coli* (ATCC® 15597-Mini-Pak™) C-3000. *Escherichia coli* (Migula) Castellani y Chalmers.

American Type Culture Collection. Product Sheet Escherichia coli bacteriophage MS2 (ATCC® 15597B1 ™).

NSF. 2002. Apéndice A en: Ultraviolet microbiological water treatment systems. NSF/ANSI 55-2002.

World Health Organization. 2014. WHO International Scheme to Evaluate Household Water Treatment Technologies. Harmonized Testing Protocol: Technology Non-Specific. Geneva, Switzerland.

APENDICE G INFORMATIVO

Montaje para la evaluación de equipos intradomiciliares o domésticos en la remoción de arsénico en agua para uso y consumo humano.

G.1. Introducción.

El arsénico es un metaloide que ocupa el lugar número 20 en abundancia en la corteza terrestre, en el lugar 14 en el agua de mar y en el lugar 12 en el cuerpo humano, incluso forma parte de la constitución de más de 245 minerales [Arsenic round the world: a review. Talanta, 58:201-235.Mandal & Suzuki(5), 2002].

Si bien se encuentra en concentraciones traza en varios tipos de suelos, acumulado en forma natural, las actividades antropogénicas, como el uso de plaguicidas y principalmente la extracción y explotación de minerales, han acelerado su acumulación en el ambiente. Por su naturaleza geológica, nuestro país está considerado dentro de las 17 zonas en el mundo que presentan contaminación del agua por este metaloide [Arsenic-contaminated soils: I. risk assessment. Brandstetter(2) *et al*, 2000].

La presencia de arsénico disuelto en Agua para consumo humano ha cobrado importancia mundial, principalmente por sus efectos cancerígenos; esto ha originado la promulgación por parte de la EPA y de OMS de nuevos niveles permisibles [Arsenical removal from water / wastewater using adsorbents – A critical review. Journal of Hazardous Materials, Mohan & Pittman(6),2007].

Los seres humanos están expuestos al arsénico por el aire, por los alimentos y principalmente por el agua. La presencia de arsénico inorgánico en cuerpos de agua con fines de consumo humano, cuya concentración natural varía de 0.5 a más de 5000 g L^{-1}, fue identificada como el principal riesgo a la salud. Debido a la toxicidad de este metaloide y los problemas de salud que genera, la concentración máxima permisible en Agua para consumo humano es de 10 ug L^{-1} [Technologies and costs for removal of arsenic from Drinking Water, USA, Environmetal Protection Agency(3), Dic. 2000].

G.2. Objetivo.

Determinar si el equipo cumple, en complemento a la remoción de microorganismos patógenos, con la remoción de arsénico en agua, a la concentración máxima indicada por el fabricante bajo las condiciones de operación previamente descritas en el manual o instructivo del equipo.

G.3. Fundamento.

El arsénico en agua se presenta en diferentes especies que dependen de las propiedades químicas del medio, pudiendo existir con números de oxidación de -3, 0, +3, y +5 [A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* Smedley(7), P. L.; Kinniburgh, D. G. (2002). En agua a pH´s naturales se encuentra generalmente en forma inorgánica como arsenito (As^{+3}) y/o arsenato (As^{+5}). El As^{+3} es un ácido fuerte, forma complejos preferentemente con óxidos y con el nitrógeno y es 25 a 60 veces más tóxico que el arsenato. Por el contrario, el As^{+5} se comporta como un ácido débil, formando complejos con sulfuros [Environmental Inorganic Chemistry: Properties, Processes and Estimation Methods. Ed. Pergamon Press, Estados Unidos, Bodek(1), I.; Lyman, W.J.; Reechl, W.F.; Rosenblalt, D.H. (1998)].

Las especies de arsenato predominan y son estables en ambientes aerobios ricos en oxígeno tales como las aguas superficiales, mientras que las especies de arsenito predominan en ambientes moderadamente reductores anaerobios tales como las aguas subterráneas [Tesis de maestría “Remisión de arsénico en agua por electrocoagulación”. UNAM 2010. García Espinosa J. E(4)]. Por lo que es importante determinar que las tecnologías a pequeña escala tipo intradomiciliarias y/o doméstico traten agua previamente aireada o de origen superficial.

G.4. Metodología.

El montaje para la evaluación dependerá del modo de operación de los equipos o sustancias a evaluar. Pero la idea central es hacer pasar durante todo el tiempo de prueba la misma concentración de arsénico máximo que el equipo establece que elimina, con lo que podrá acotarse con mayor precisión y confiabilidad el volumen máximo de vida útil de los equipos. Partiendo de que la mayoría de los equipos comerciales son probados con agua de la red, sin la presencia de los diferentes parámetros de las aguas naturales promedio a nivel nacional y que influyen en la eficiencia en la remoción del (de los) parámetro (s) de interés, por lo que la eficiencia real de volumen de agua tratada debe ser menor a la que realmente las empresas reportan.

G.4.1 Agua problema.

Para el desarrollo deberán probarse dos tipos de agua. En el caso del agua tipo I y mediante disoluciones de $Na_2HAsO_47H_2O$ la concentración de arsénico As^{+5} será ajustada en aproximadamente 100 ug L^{-1} en el agua problema, esta concentración de arsénico se ubica en el límite inferior dentro de los valores reportados frecuentemente en las zonas del país con problemas de arsénico en fuentes de abastecimiento para agua potable [Parga et al, 2003].

Para el tipo de agua II deberá ser preparada adicionando los parámetros más comunes que afectan la eficiencia de los sistemas convencionales de remoción de arsénico (Tabla G.1, de esta Norma), partiendo de lo que las autoridades sanitarias consideren como prioritarios con base a los monitoreos nacionales de calidad del agua.

Tabla G.1.

Concentraciones máximas de parámetros que afectan la eficiencia en la remoción de Arsénico

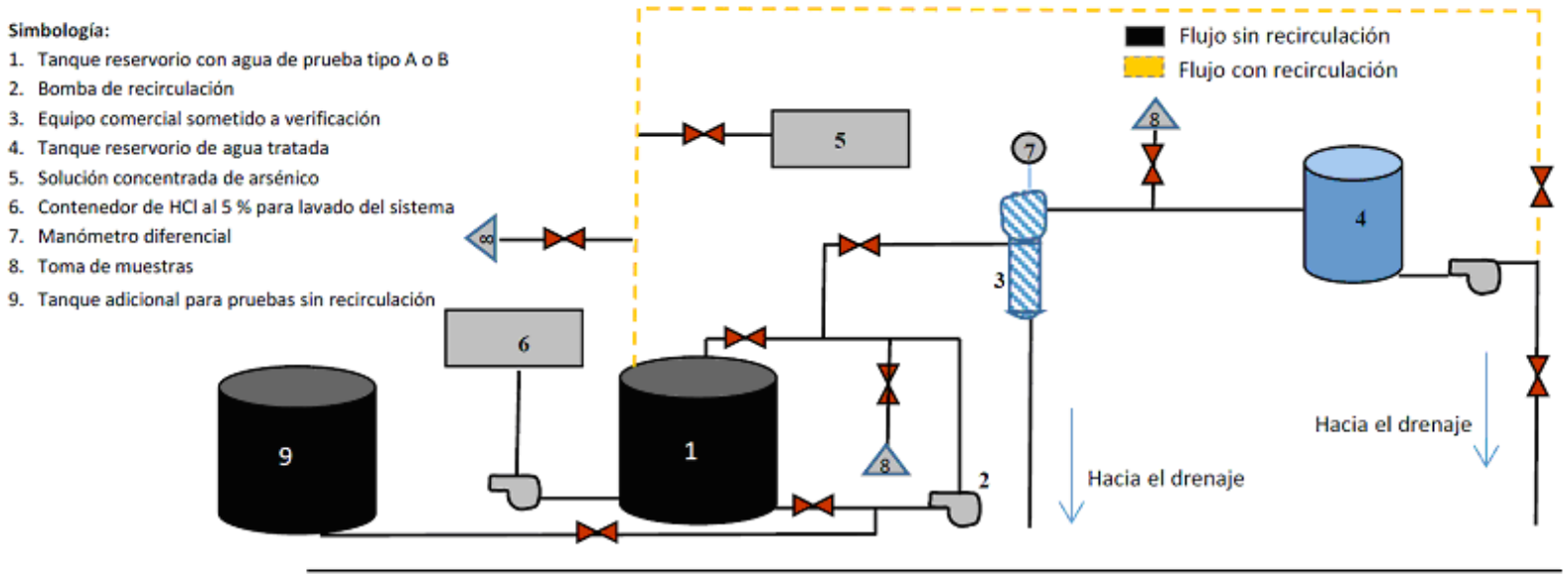
Parámetro	Concentración problema
Sílice	Mayor a 50 mg/L
Fluoruro	Mayor a 2 mg/L
Hierro	Mayor a 3 mg/L
Manganeso	Mayor a 0.05 mg/L
Sulfuros	Mayor a 0.2 mg/L
Sulfatos	Mayor a 360 mg/L
Sólidos Disueltos Totales	Mayor a 1.000 mg/L
Carbono Orgánico Total	Mayor a 4 mg/L
Calcio y magnesio (dureza), bario, sulfato y carbonato	Mayor a la saturación potencial
Cloruros	Mayor a 250 mg/L
Cloro libre	En función del tren de tratamiento empleado
Turbiedad	Mayor a 0.3 NTU
pH	En función del tren de tratamiento empleado
Fosfato	Mayor a 1.0 mg/L

G.4.2 Modo de operación continúa con o sin recirculación para un flujo mínimo de 1 L / minuto.

Para la realización de las pruebas se construirá una unidad piloto (Figura G.1 de esta Norma), en cuyo arreglo se empleará tubería de PVC hidráulico de ½“. Tanques o tinacos con el volumen necesario para la operación continúa de 24 h al flujo establecido en el manual de operación del fabricante, que alimentara al equipo sometido a verificación mediante una bomba con los requerimientos teóricos de presión y flujo mínimo y máximo requeridos.

La configuración hidráulica del sistema deberá permitir controlar el flujo de salida y entradas del equipo hacia un tanque reservorio del agua tratada, donde podrá desecharse a la red de drenaje o hacia la red de recirculación, así como la toma de muestras durante toda la configuración hidráulica. El equipo deberá contener un manómetro diferencial para verificar adicionalmente la presión real de operación del equipo, así como de rotámetros necesarios para la medición del flujo.

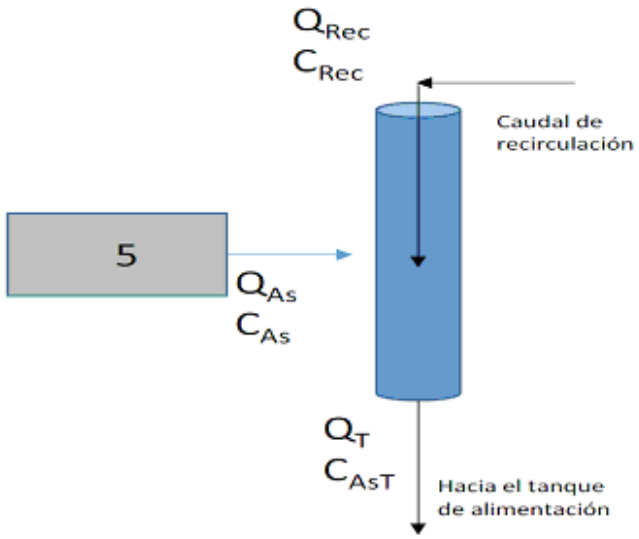
Figura G.1. Montaje para la verificación de equipos en la remoción de Arsénico en Agua para uso y consumo humano.



En el caso de recirculación, podrá optarse por dos alternativas para alimentar la misma concentración de arsénico durante todo el tiempo de operación; la primera consiste en preparar Lotes del agua problema cada día de operación y mediante una modificación inicial agregar un tanque reservorio adicional; la segunda opción consiste en preparar una solución concentrada de arsénico y mediante el balance de masa (Figura G.2, de esta Norma) en forma continua determinar el flujo de bombeo necesario que deberá mezclarse con el flujo de la red utilizada para generar aproximadamente la concentración de arsénico deseada.

Figura G.2

Esquema para el balance de masa para ajuste de la concentración inicial de arsénico en el flujo de recirculación.



Dónde:

Q_{As}= Flujo de agua suministrada a la red experimental de la solución concentrada (L s^{-1}).

C_{As} = Concentración de arsénico en la solución concentrada (mg L^{-1}).

C_{Rec} = Concentración de arsénico en el flujo de recirculación (mg L^{-1}).

Q_{Rec}= Flujo de agua recirculada (L s^{-1}).

C_{AsT} = Concentración de arsénico en el flujo de entrada a la red (mg L^{-1}).

Q_T = Flujo total del agua de entrada a la red (L s^{-1}).

Con el planteamiento de la ecuación de balance siguiente, puede determinarse la concentración de flujo del agua de la solución concentrada con la presión adecuada para su mezcla con el flujo recirculado.

$$Q_{As} \times C_{As} + Q_{Rec} \times C_{Rec} = Q_T \times C_{AsT}$$

Finalmente, el arreglo hidráulico deberá permitir el lavado químico de la red utilizada entre cada equipo probado o para el caso de que se requiera verificar remoción de otro parámetro, seguido de un lavado con agua de la llave para eliminar cualquier residuo o impurezas desprendidas.

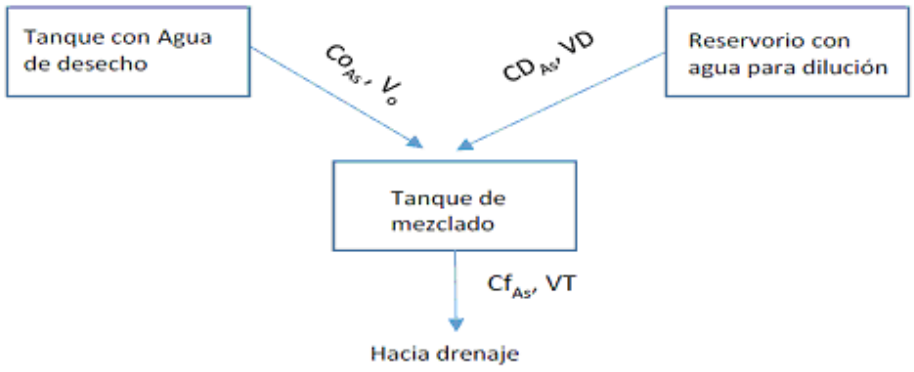
La determinación de arsénico total inicial y el residual, podrá realizarse mediante espectrometría de absorción atómica, espectrofotometría o por cualquier otro método colorimétrico, confirmando su precisión con una muestra estándar por lo menos en el 10% del número de muestras totales determinadas.

G.5. Desecho del agua de lavado contaminada con arsénico.

La EPA emitió en el año 2000 el documento denominado “Technologies and costs for removal of arsenic from Drinking Water, USA, Environmetal Protection Agency[3], Dic. 2000] en donde se proponen diferentes alternativas para el tratamiento y disposición de lodos derivados de Procesos de remoción de arsénico seleccionados en función de los recursos económicos y de infraestructura disponibles. Sin embargo, en el caso de equipos a baja escala o con generación relativamente baja de volumen de agua de desecho con arsénico se recomienda la dilución con base al criterio máximo permisible determinado por las disposiciones aplicables o por la concentración máxima natural endémica de la región en particular.

En el esquema siguiente se presenta el planteamiento para las ecuaciones de balance necesarios.

Figura G.3 Diagrama del balance de masa para la disolución de arsénico en el agua vertida a la red



Donde:
Co_{As} = Concentración de arsénico en el agua de desecho (ug/L)
V_o= Volumen del agua de desecho (L)
CD_{As}= Concentración de arsénico en el agua para dilución
VD= Volumen de agua para dilución (L)
Cf_{As}= Concentración de arsénico en el agua vertida al drenaje
VT= Volumen total de agua generada (L)

A partir del esquema anterior se establece en balance de materia siguiente:

$$Co_{As} * Vo + CD_{As} * VD = Cf_{As} * VT$$

Y considerando que el agua de la red que servirá para dilución es cero (0) CD_{As}= 0, entonces:

$$VT\ (L) = \frac{Co_{As} * Vo}{Cf_{As}}$$

Finalmente el Volumen de dilución se determina:

$$\boldsymbol{VD\ (L) = VT - Vo}$$

En la tabla siguiente se presentan los cálculos para diferentes condiciones hipotéticas de operación.

Tabla G.2. Calculo del Volumen de agua requerido para dilución en función del volumen de agua de desecho, de su concentración y de la concentración final requerida.

$Co_{As\ (ug/L)}$	Vo (L)	CfAs	VT (L)	VD (L)	Factor VD/Vo
500	3000	25	60,000	57,000	19
500	3000	20	75,000	72,000	24
500	3000	10	150,000	147,000	49
500	2000	25	40,000	38,000	19
500	2000	20	50,000	48,000	24
500	2000	10	100,000	98,000	49
500	1,000	25	20,000	19,000	19
500	1000	20	25,000	24,000	24
500	1000	10	50,000	49,000	49
400	3000	25	48,000	45,000	15
400	2000	25	32,000	30,000	15
400	2000	10	80,000	78,000	39
400	1000	25	16,000	15,000	15
400	1000	10	40,000	39,000	39
300	3000	25	36,000	33,000	11
300	3000	10	90,000	87,000	29
300	2000	25	24,000	22,000	11
300	1000	20	15,000	14,000	14
300	1000	10	30,000	29,000	29
200	3000	25	24,000	21,000	7
200	3000	10	60,000	57,000	19
200	2000	25	16,000	14,000	7
200	2000	10	40,000	38,000	19
200	1000	20	10,000	9,000	9
200	1000	10	20,000	19,000	19
100	3000	25	12,000	9,000	3
100	2000	25	8,000	6,000	3
100	1500	25	6,000	4,500	3
100	1000	25	4,000	3,000	3
100	1000	10	10,000	9,000	9

G.6. Bibliografía.

G.6.1 Bodek, I.; Lyman, W.J.; Reechl, W.F.; Rosenblalt, D.H. (1998). Environmental Inorganic Chemistry:Properties, Processes and Estimation Methods. Ed. Pergamon Press, Estados Unidos [http://trove.nla.gov.au/work/18800643?q&versionId=22070579].

G.6.2 Brandstetter, A., Lombi, E., Wenzel, W.W., Adriano, D.C., 2000. Arsenic-contaminated soils: I. risk assessment. In: Wise, D.L., Torantolo, D.J., Cichon, W.J., Inyang, H.I., Stottmeister, U. (Eds.), Remediation Engineering of Contaminated Soils. Marcel Dekker, New York, pp. 715/737. [https://books.google.com.mx/books?id=qVwz8c_Y5OcC&pg=PA715&lpg=PA715&dq=Brandstetter,+A.,+Lombi,+E.,+Wenzel,+W.W.,+Adriano,+D.C+in+Remediation+Engineering+of+Contaminated+soils&source=bl&ots=ZWIw3M8AI5&sig=v0fX-h1YgpeD_YZC2jVDU8l8c7c&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwjNv9vl-JDVAhXC5SYKHW3LDoAQ6AEIPzAD#v=onepage&q=Brandstetter%2C%20A.%2C%20Lombi%2C%20E.%2C%20Wenzel%2C%20W.W.%2C%20Adriano%2C%20D.C%20in%20Remediation%20Engineering%20of%20Contaminated%20soils&f=false]

G.6.3 Environmetal Protection Agency (EPA, Washington). Dic. 2000. Technologies and costs for removal of arsenic from Drinking Water. USA. [https://www.ircwash.org/resources/technologies-and-costs-removal-arsenic-drinking-water]

G.6.4 García Espinosa J. E. Tesis de maestría "Remisión de arsénico en agua por electrocoagulación". UNAM 2010. [http://docplayer.es/45323234-T-e-s-i-s-universidad-nacional-autonoma-de-mexico-remocion-de-arsenico-en-agua-por-electrocoagulacion-m-a-e-s-t-r-o-e-n-i-n-g-e-n-i-e-r-i-a.html]

G.6.5 Mandal, B. K.; Suzuki, K. T. (2002). Arsenic round the world: a review. Talanta, 58:201-235. [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914002002680?via%3Dihub]

G.6.6 Mohan, D.; Pittman, U. C. Jr. (2007). Arsenical removal from water / wastewater using adsorbents – A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 142, 1-2, Páginas: 1-53

[http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=EAE37A497964F8435EC5E23ABBFA1708?doi=10.1.1.665.4964&rep=rep1&type=pdf].

G.6.7 Smedley, P. L.; Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry,* 17: 517-569 [http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.563.7185&rep=rep1&type=pdf].

G.6.8 NMX-AA-051-SCFI-2001, Análisis de Agua. Determinación de Metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas. Método de prueba

G.6.10 Norma Mexicana NMX-AA-46-1981, Análisis de Agua. Determinación de Arsénico.

G.6.11 Norma Oficial Mexicana NOM 117-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método de Prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.