

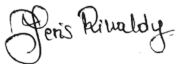

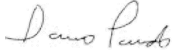
Procedimiento para la determinación de la eficiencia a la filtración bacteriana

AOXLAB S.A.S

DOCUMENTO CONTROLADO

PROC-TC- Procedimiento para la determinación de la eficiencia a la filtración bacteriana según UNE EN 14683

Copia controlada No. :1


	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Yesica Lorena Correa Restrepo Yeris Mercedes Rinaldy Mojica	Analista microbiología de		2022-11-21
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Director de calidad		2020-11-21
Aprobó:	Dario Pardo Pardo	Director técnico		2020-04-22
Localización del documento:		http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig		

Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2020-04-22	1	Ninguno (versión original).	YLCR	DPP	YELP
Vigente	2022-11-21	2	Se cambia estilo según manual identidad.	YMRM	APPP	DPP

Contenido

1. OBJETIVO Y ALCANCE.....	4
1.1 Objetivo.....	4
1.2 Alcance	4
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	4
2.1 Definiciones.....	4
2.2 Notaciones.....	5
3. REFERENCIAS.....	5
4. DESARROLLO.....	5
4.1 Actividades previas.....	5
4.1.1 Inspección de la muestra.....	5
4.1.2 Estabilización.....	6
4.1.3 Verificación de equipos y áreas de ensayo	7
4.1.4 Manejo de la muestra.....	7
4.1.5 Medidas de seguridad.....	7
4.2 Patrones y equipos de medición.....	7
4.3 Materiales y consumibles	8
4.4 Reactivos y/o soluciones:.....	8
5. Instrucciones de ensayo	8
5.1 Preparación de soluciones de trabajo	8
5.2 Procedimiento de ensayo.....	8
5.2.1 Preparación del inóculo:.....	8
5.2.2 Montaje.....	9
5.3 Interpretación de Resultados	9
5.4 Recuento de UFC y Cálculos.....	10
5.5 Informe del ensayo	10
6. Aseguramiento de la calidad.....	10
7. RESPONSABILIDADES.....	10
7.1 Director técnico.....	10
7.2 Líder de Calidad.....	11
7.3 Líder de Laboratorio.....	11
7.4 Analista.....	11
8. FORMATOS RELACIONADOS.....	11
9. ANEXOS.....	12

	Procedimiento para la determinación de la eficiencia a la filtración bacteriana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-202
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2022-11-21

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.

Determinar la eficiencia de filtración bacteriana que tiene un material textil como barrera frente a la penetración bacteriana.

1.2 Alcance

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método
Eficiencia de la filtración bacteriana	UNE EN 14683:2019	Recuento de colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923

Este método se aplica a las siguientes matrices:

- Materiales (mascarillas, textiles)

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones.


Eficacia de la filtración bacteriana (BFE) [1]: Eficacia de los materiales de las mascarillas como una barrera frente a la penetración bacteriana

Aerosol [1]: Suspensión gaseosa de partículas sólidas y/o líquidas.

Mascarilla quirúrgica[1]: Producto sanitario que cubre la boca y la nariz, proporciona una barrera para minimizar la transmisión directa de agentes infecciosos entre individuos.

Filtro [1]: Material utilizado para la separación o deposición mecánica y física de partículas de aerosol (líquido o sólido) en el aire inhalado o exhalado

Impactador [1]: sistema de impactación de aire en tamices basados en el principio de impactación de Anderson. El aire se aspira a través de una tapa perforada. Un ventilador radial, controlado por un sensor de flujo, regula con precisión el flujo del aire.

	Procedimiento para la determinación de la eficiencia a la filtración bacteriana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-202
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2022-11-21

Agente infeccioso [1]: Microorganismos que se ha demostrado que causa infecciones de heridas quirúrgicas o que podría causar infección en pacientes, miembros de equipo quirúrgico u otras personas

***Staphylococcus aureus* [3]:** especie «coagulasa positiva», es un reconocido patógeno humano, siendo el agente responsable de un amplio espectro de intoxicaciones de origen comunitario y hospitalario.

Límites microbiológicos [2]: Son los valores permisibles de microorganismos presentes en una muestra, que indican la aceptabilidad higiénico-sanitaria de una superficie.

2.2 Notaciones.

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

“**Laboratorio**”: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.

“**Informe de resultados**”: se refiere a los informes de ensayo que emite el Laboratorio.

“**Servicios**”: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

3. REFERENCIAS.

[1] NTC 1733:2020 Mascarillas quirúrgicas, requisitos y métodos de ensayo

[2] Vocabulario internacional de metrología: conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). 1er edición en español, 2008

[3] NTC 4779: Microbiología de alimentos y alimentos para animales. método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies).

[4] ASTM F2101-19 Evaluating the Bacterial Filtration Efficiency (BFE) of Medical Face Mask Materials, using a biological aerosol of *Staphylococcus aureus*

[5] UNE-EN 14683:2019 Norma española. Mascarillas quirúrgicas. Requisitos y métodos de ensayo

4. DESARROLLO.

4.1 Actividades previas.

4.1.1 Inspección de la muestra.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, éste es inspeccionado a fin de asegurar que se garantizan las condiciones conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".

Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que la muestra se encuentra empacada y sellada herméticamente, y etiquetada con el sticker de identificación interna del laboratorio. Las muestras de ensayo se deben cortar a partir de mascarillas completas. Una mascarilla completa se puede utilizar en lugar de una muestra cortada, siempre que se eliminen las extremidades, la mascarilla se disponga plana y se incorporen todas las capas (en caso de mascarillas plegadas, se ha de desplegar la mascarilla para ensayar una superficie lo más plana posible). Cada muestra debe tener unas medidas de 100 mm x 100 mm y debe incluir todas las capas de la mascarilla en el orden en que están colocadas en la mascarilla completa. El número de muestras que se deben ensayar es un mínimo de 5.

Las muestras para la prueba se tomarán de mascarillas médicas terminadas, con todas las capas dispuestas en el orden correcto.

En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de laboratorio.

4.1.2 Estabilización.

Una vez revisada la muestra, se aplican las siguientes instrucciones:

Los patrones y equipos de referencia del laboratorio a intervenir en el ensayo como son las balanzas se mantienen en el lugar de ensayo encendidas, antes de realizar las mediciones, a fin de lograr su operación óptima o estabilización térmica. las soluciones usadas para el ensayo se deben sacar 1 hora antes de refrigeración para que tomen temperatura ambiente. Para las muestras de análisis se debe garantizar las condiciones mencionadas en el numeral 4.1.4

Condición ambiental	Mínima	Máxima	Observación
Temperatura ambiente	18,00	25,00	Condiciones establecidas por el laboratorio
Humedad relativa	20,00	50,00	Condiciones establecidas por el laboratorio

Las condiciones ambientales fueron establecidas con el fin de garantizar que no se afecte la confiabilidad de los resultados de los ensayos para reducir al mínimo toda alteración en la cantidad de microorganismos presentes en el ambiente, además de la preservación de muestras y medios de cultivo que deben permanecer a temperatura ambiente.

Estas condiciones son monitoreadas y registradas automáticamente por el software 3sense del laboratorio.

4.1.3 Verificación de equipos y áreas de ensayo

A fin de confirmar que los equipos a utilizar en el ensayo se encuentran en condiciones adecuadas para realizar el servicio, se inspecciona que se haya realizado la verificación diaria de la balanza gramera de acuerdo con el procedimiento PROC-TC-005, se debe garantizar la desinfección de la cabina y que haya permanecido al menos 30 minutos con luz-UV encendida, se debe garantizar que antes de cada ensayo se realice una adecuada limpieza y desinfección de mesones e implementos a utilizar, además haber realizado una aspersion en los ambientes de acuerdo al PROC-TC-031

4.1.4 Manejo de la muestra.

Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, se siguen las instrucciones dadas en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

Al tomar la porción de análisis, garantizar que la muestra este por mínimo 4 h a una temperatura de 21 ± 5 °C y una humedad relativa de $85 \pm 5\%$ antes de realizar los ensayos, estas condiciones se garantizan en el cuarto de análisis físico que es donde están almacenadas las muestras.

4.1.5 Medidas de seguridad.

Se deben seguir las siguientes medidas de seguridad antes y durante la realización del servicio: Verificar que el sticker de calibración y mantenimiento del equipo se encuentre vigente (ubicados en el módulo 1 del laboratorio) y no requiere alguna intervención. Verificar que todos los reactivos preparados en el laboratorio al momento de realizar el ensayo o los que se encontraban almacenados se encuentren identificados conforme al formato FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio". En caso de que se encuentre alguna anomalía al respecto, avisar a la Dirección Técnica a través del Líder de Laboratorio.

Durante el análisis tener en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar ningún parámetro.

Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC- 015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo IX

4.2 Patrones y equipos de medición.

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos y componentes clave:

- Vortex
- Transfer pipeta de 1000 μ l
- Transfer pipeta de 100 μ l
- Cabina flujo laminar
- Incubadora a 35 °C
- Nebulizador

- Impactador MAS 100

4.3 Materiales y consumibles

- Puntas para transfer pipeta de 1000 µL
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Cajas de Petri plásticas estériles
- Asa y/o rastrillo microbiológico

Material debidamente lavado, secado y esterilizado (Ver PROC-TC 026-027)

4.4 Reactivos y/o soluciones:

- Agua peptonada 0.1%
- Agar tripticasa de soya
- Suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 1×10^5 UFC

5. Instrucciones de ensayo

5.1 Preparación de soluciones de trabajo

Solución	Cantidad reactivo	Cantidad diluyente (Agua)	Observaciones
Agar tripticasa de soya	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 a 20 ml por cada caja de Petri.
Agua Peptonada estéril 0.1%	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 9 ml por cada tubo de ensayo.

Material debidamente lavado, secado y esterilizado (Ver PROC-TC 026-027)

5.2 Procedimiento de ensayo

5.2.1 Preparación del inculo:

A partir de un cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de 24 a 48 horas, tomar aproximadamente 2 colonias, se debe inocular en 10 ml de agua peptona, agitar suavemente e incubar a una temperatura de (37 ± 2) °C durante (24 ± 2) h, para obtener una concentración aproximada de 1.5×10^8 células

- A partir de la suspensión anteriormente preparada (tomar como dilución 10^0), realizar diluciones seriadas hasta 10^{-2} y 10^{-3} para usar como suspensión de prueba, obteniendo aproximadamente 5×10^5 UFC/ml
- Sembrar las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} en placas de Petri film para realizar el recuento de las suspensiones y guardarlas en la nevera hasta el día siguiente para saber cuál dilución se debe usar.
- La población del inóculo bacteriano se debe mantener comprendida entre $1,7 \times 10^3$ y $3,0 \times 10^3$ UFC por ensayo. El inóculo bacteriano se debe determinar basándose en la experiencia y en placas de control positivo previas y la dilución de la suspensión de inoculación se debe ajustar en consecuencia.

5.2.2 Montaje

- Ensamblar el nebulizador a la columna de vidrio
- Se efectúa una serie experimental de control negativo haciendo pasar aire, sin adición del inóculo bacteriano, a través del impactador
- Introducir el inóculo bacteriano en el reservorio del nebulizador.
- Colocar la caja de Petri que contiene agar TSA en el impactador y cerrar
- Se efectúa una serie experimental de control positivo sin ninguna muestra de ensayo al inicio y fin del proceso. Colocar la columna encima de la tapa del impactador e iniciar la inoculación bacteriana encendiendo el nebulizador y ajustando el volumen a través del impactador en cascada a 28 L
- Para iniciar los ensayos de debe colocar la muestra entre la entrada de aire del impactador y la columna de vidrio
- Prender el nebulizador para que empiece a introducir la suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus* dentro de la columna de vidrio.
- Encender el impactador y seleccionar la opción de 28 L, esperar hasta que haga el ciclo automáticamente.
- Apagar el nebulizador y prender nuevamente el impactador a 28 L, esperar hasta que haga el ciclo.
- Retirar la caja de Petri e incubar de forma invertida a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 20 - 52 horas
- Se deben realizar 5 repeticiones por cada muestra de ensayo

5.3 Interpretación de Resultados

Después de la incubación, leer las cajas sobre un fondo blanco y reportar el número de colonias presentes

El rango preferible de conteo en una placa es inferior o igual a 300 colonias.

Cuando la cantidad estimada de colonias supere los 300, calcule el recuento. Determine el promedio de colonias en un cuadrado (1 cm^2) y multiplíquelo por 55 para obtener el recuento total por placa o divida la caja en cuadrantes iguales y el recuento de cada cuadrante se multiplica por el total de cuadrantes.

Se debe realizar el recuento en cada una de las 5 cajas por muestra y sacar el promedio
Se debe sacar el promedio entre el control positivo inicial y final.

5.4 Recuento de UFC y Cálculos

$$B = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Donde

C: Es el promedio de los recuentos totales obtenidos en los controles positivos

T: es el promedio de los recuentos totales en cada una de las réplicas de ensayo.

El resultado obtenido en la formula corresponde al porcentaje de filtración bacteriana de la muestra analizada

5.5 Informe del ensayo

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

- Número y fecha de norma europea
- Número de lote o número de serie de las mascarillas ensayadas
- Dimensiones de las muestras de ensayo y el tamaño del área ensayada
- Cuál de los lados de la muestra de ensayo miraba hacia el aerosol inoculante
- Volumen durante el ensayo
- Media de los recuentos de placas totales de los dos controles positivos
- Recuento de placas del control negativo
- Eficacia de la filtración bacteriana (BFE) para cada muestra de ensayo.

6. Aseguramiento de la calidad

Para asegurar y controlar la validez de los resultados, por cada muestra se deben realizar 5 repeticiones. Así mismo, en cada lote de ensayo, se debe realizar control de esterilidad de los medios de cultivo, control positivo al inicio y final del proceso, control negativo.

7. RESPONSABILIDADES.

7.1 Director técnico.

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Revisar y aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.
- Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.
- Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.
- Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.

7.2 Líder de Calidad.

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Realizar y registrar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método.
- Archivar los registros técnicos relacionados con los ensayos.


7.3 Líder de Laboratorio.

- Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.
- Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al director técnico las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder de calidad y al director técnico.
- Informar los casos en los que se deben de retener las muestras.
- Supervisar el cumplimiento de las actividades de aseguramiento de calidad.

7.4 Analista.

- Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio
- Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.
- Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.
- Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.
- Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al líder de laboratorio las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder del laboratorio.
- Informar cualquier incidente que suceda durante la realización del método.
- Revisar que los equipos usados en el desarrollo del método tengan mantenimiento, calibración y/o verificación vigente, de acuerdo con el programa de mantenimiento y calibración.

8. FORMATOS RELACIONADOS.

	Procedimiento para la determinación de la eficiencia a la filtración bacteriana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-202
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2022-11-21

FOR-TC-099 "Formato de carta de control para humedad"

FOR-TC-100 "Formato de carta de control para temperatura ambiente"

FOR-TC-075 "Formato para el registro de datos primarios de análisis microbiológicos"

SOFT-TC- "Cuadro de mando para ensayos microbiológicos en tapabocas"

FOR-TC-045 "Formato para el registro de información y asignación de lote de las soluciones preparadas para uso en los ensayos"

9. ANEXOS.

No aplica