

Capítulo I

Reconocimiento de materiales, reactivos y equipos. Manipulación y medidas de seguridad

Objetivos

- Describir los materiales y los reactivos de uso rutinario en el laboratorio de Microbiología.
- Reconocer el funcionamiento de los diferentes equipos.
- Ejercitar la manipulación de asas, tubos y cajas de Petri, teniendo en cuenta las medidas de bioseguridad.

Introducción

La microbiología estudia los microorganismos y sus actividades, su morfología, estructura, reproducción, fisiología, metabolismo y genética, cómo están distribuidos en la naturaleza, sus interacciones con otros organismos, los efectos perjudiciales que ejercen sobre los seres vivos y las alteraciones físicas y químicas que provocan en su entorno.

Sin el conocimiento de los microorganismos, la biología sería mucho más limitada, no sabríamos que hay vida en condiciones de temperatura, salinidad o pH extremas, y la fotosíntesis solamente sería aerobia y oxigénica.

Materiales, reactivos y equipos

Portaobjetos (láminas)

Cubreobjetos (laminillas)

Cajas de Petri

Tubos de ensayo, probetas, erlenmeyers, pipetas

Asas de Drigalsky (rastrillo)

Asas bacteriológicas y micológicas

Gradillas

Pinzas

Dispensadores

Mechero de Bunsen

Medios de cultivo comerciales

Colorantes

Cámara de flujo laminar

Microscopios

Estereoscopios

Recuenta colonias

Autoclave

Incubadora

Horno de aire caliente

Baño serológico

Centrífuga

Balanzas

Espectrofotómetro

Procedimiento

1. El profesor dará las explicaciones sobre los materiales y reactivos que se utilizan en el laboratorio de microbiología. En relación con los equipos, solo se

mencionarán sus características generales, ya que su uso se explicará a medida que se desarrollen los demás laboratorios.

2. Cada uno de los estudiantes manipulará asas, tubos y cajas de Petri, teniendo en cuenta las medidas de bioseguridad e indicaciones del docente y las figuras 1, 2 y 3.

1.1 Bioseguridad en el laboratorio de microbiología

Generalidades

Se reconocen cuatro niveles de bioseguridad (BSL), que constan de combinaciones de prácticas y técnicas de laboratorio, equipos de seguridad e instalaciones de laboratorio. Cada combinación es específicamente apropiada para las operaciones llevadas a cabo, las vías de transmisión documentadas de los agentes infecciosos, y la función o la actividad del laboratorio (APHA, 2004, <https://www.cdc.gov/training/biosafety>).

Nivel de bioseguridad 1. Se trabaja con microorganismos no patógenos identificados y con patógenos oportunistas, como los estudiados en laboratorios de fundamentos de microbiología. Son agentes biológicos que tienen escasísimas probabilidades de causar enfermedades en el ser humano y tienen pocas posibilidades de propagarse en la población.

Nivel de bioseguridad 2. Incluyen agentes biológicos y muestras con un potencial de riesgo que va de moderado a alto para el personal y el medio ambiente, es decir que pueden ser causa de enfermedades humanas y que podrían constituir un peligro para los trabajadores. Pero poco probable que se propaguen en la población y se suele disponer de profilaxis o tratamientos efectivos. Son microorganismos como los estudiados en laboratorios de enseñanza, en diagnóstico microbiológico y laboratorios de microbiología en un centro de atención primaria..

Difiere del nivel de bioseguridad 1 en que el personal del laboratorio cuenta con una capacitación específica en la manipulación de agentes patogénicos y está dirigido por personal competente. El acceso al laboratorio es limitado cuando se están desarrollando actividades. Se toman precauciones extremas

con elementos cortantes contaminados, y ciertos procedimientos que pueden generar aerosoles infecciosos, se llevan a cabo en cabinas de seguridad biológica.

Nivel de bioseguridad 3. Agentes biológicos indígenas o exóticos que pueden ser causa de enfermedades humanas graves o potencialmente letal como resultado de la exposición por vía de inhalación. Puede existir el riesgo de que se propaguen en la población, pero se suele disponer de profilaxis y tratamientos efectivos. Aplicable a las instalaciones clínicas, diagnóstico especializado, enseñanza, investigación o producción. El personal de laboratorio recibe instrucción específica en el manejo de agentes patogénicos y potencialmente letales, y es supervisado por científicos competentes con experiencia en el trabajo con estos agentes.

Todos los procedimientos que involucren la manipulación de materiales infecciosos se efectúan dentro de cabinas de bioseguridad u otros dispositivos de contención física, o por personal que lleva ropa y equipo protector adecuado. El laboratorio debe tener características de diseño e ingeniería especiales.

Nivel de bioseguridad 4. Agentes biológicos de altísimo riesgo o que son foráneos en el país y que requieren máxima seguridad. Son causa de enfermedades humanas graves y que constituyen un serio peligro para el personal. Puede existir el riesgo de que se propague en la población y no se suele disponer de profilaxis o tratamientos efectivos.

NIVEL DE BIOSEGURIDAD	BACTERIAS	HONGOS	PARTICULAS VIRALES
1	- <i>Escherichia coli</i> no patogénicas - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Staphylococcus epidermidis</i> - <i>Lactobacillus bulgaricus</i> - <i>Streptococcus lactis</i>	- <i>Sacharomyces cerevisiae</i> - <i>Penicillium roquefortii</i>	-Virus de hepatitis canina infecciosa
2	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Streptococcus</i> - <i>Bordetella pertussis</i> - <i>Clostridium botulinum</i> - <i>Clostridium tetani</i> - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Micobacterias oportunistas</i> - <i>Haemophilus influenzae</i> - <i>Yersinia enterocolitica</i>	- <i>Aspergillus spp</i> - <i>Candida spp</i> - <i>Cryptococcus neoformans</i> -Hongos Dermatofitos - <i>Pneumocystis jiroveci</i> - <i>Sporothrix schenckii</i> .	Adenovirus Parvovirus Rotavirus Virus de la hepatitis B Virus de la gripe Virus del sarampión Virus de las paperas Virus de la rubéola

NIVEL DE BIOSEGURIDAD	BACTERIAS	HONGOS	PARTICULAS VIRALES
2	-Especies de Salmonelas - <i>Shigella</i> - <i>Legionella</i> - <i>Borrelia</i> - <i>Neiserias</i> patógenas <i>Treponema pallidum</i> .		
3	<i>Bacillus anthracis</i> <i>Brucella</i> <i>Coxiella burnetii</i> <i>Escherichia coli</i> (verotoxigénica) <i>Francisella tularensis</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium leprae</i> <i>Rickettsias</i> <i>Salmonella</i> serotipo <i>typhi</i> <i>Shigella dysenteriae</i> serotipo 1 <i>Yersinia pestis</i> .	<i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Coccidioides immitis</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	Virus de la encefalitis de California Virus de la encefalitis equina americana Virus de la estomatitis vesicular Virus de la hepatitis B Virus de la hepatitis C Virus de la hepatitis D Virus de la fiebre amarilla VIH.
4	Virus de la viruela Virus de la fiebre hemorrágica Congo-Crimea Fiebre Lassa Virus de Marburg Virus Ébola.		

1.2 Normas de trabajo en el laboratorio de microbiología

1. La bata de laboratorio, los guantes y las gafas deben utilizarse en todas las prácticas de laboratorio.
2. No debe deambular con la bata de trabajo fuera del laboratorio.
3. Hay que lavar la bata y el gorro independientemente de otra ropa.
4. Todas las superficies de trabajo se limpiarán y desinfectarán diariamente con hipoclorito diluido al 10 % y siempre que se produzca un derrame.
5. Es recomendable colocar una hoja de papel desechable en el área desinfectada, sobre la cual se ubican el mechero y los elementos de trabajo necesarios. La hoja se descarta al terminar el trabajo en la bolsa marcada *desechos biológicos*.
6. Es necesario informar inmediatamente sobre la ocurrencia de cualquier accidente como cortaduras y quemaduras. En caso de rompimiento de tubos con cultivos microbianos, cubrir los restos del tubo con hipoclorito

de sodio al 2 % o fenol al 5 %, tapar con una hoja de papel periódico y dejar sedimentar los aerosoles durante media hora, luego recoger el material, envolverlo en papel y llevarlo a esterilización antes de descartarlo.

7. En la zona de trabajo no deben colocarse materiales de escritorio, ni libros. Mantener el puesto de trabajo solamente con el material necesario.
8. Al utilizar el asa para siembras, debe calentarse el alambre de ferroníquel en toda su extensión, a la llama del mechero hasta que se ponga roja, este proceso debe realizarse antes y después del uso. El flameado o proceso de esterilización por incineración destruye cualquier forma de vida sobre la superficie del asa. **No mover el asa durante su calentamiento para evitar la formación de aerosoles** (Figura 1).

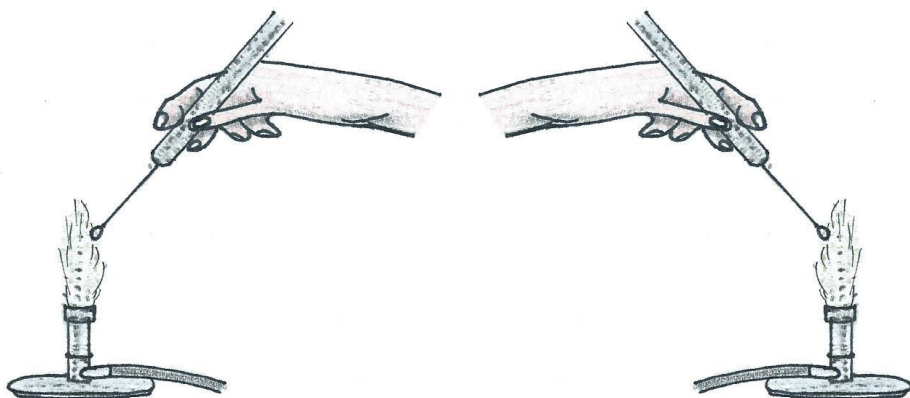


Figura 1. Uso del asa con la mano derecha e izquierda.

Fuente: Aura Lizarazo Forero

9. Si se trabaja con tubos, se debe flamear la boca de estos después de quitarles el tapón y antes de volverlos a tapar, para evitar la formación de aerosoles o la contaminación del contenido del tubo. Durante las siembras, el tubo debe mantenerse en la mano izquierda y el tapón en la mano derecha, sostenido entre el dedo meñique y la palma de la mano, cerca de la llama del mechero, con esta misma mano debe cogerse el asa entre el dedo índice y el pulgar, o viceversa si es zurdo (Figura 2).

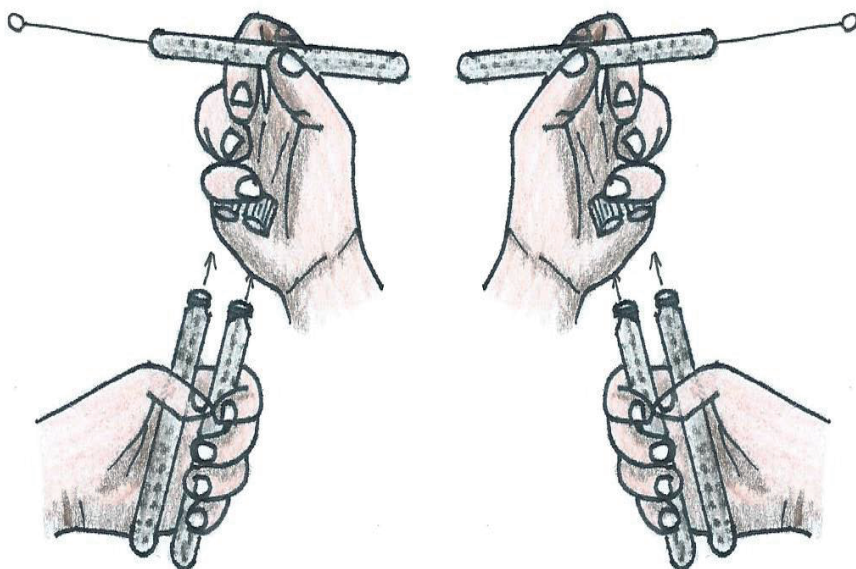


Figura 2. Manipulación de tubos taparrosclas con la mano derecha e izquierda.

Fuente: Aura Lizarazo Forero

10. Cuando se trabaja con cajas de Petri, estas se destapan manteniendo la base y la tapa simultáneamente en la mano izquierda, abriendo la caja parcialmente y cerca del mechero (Figura 3).

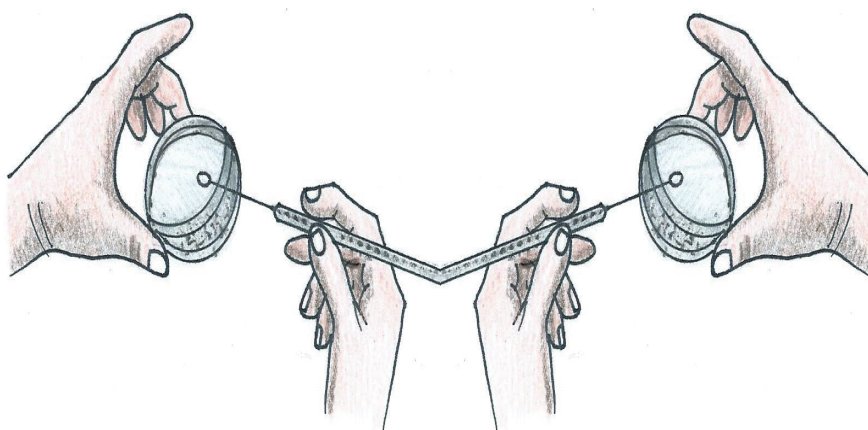


Figura 3. Manipulación de cajas de Petri con la mano derecha e izquierda.

Fuente: Aura Lizarazo Forero

11. Pipetear aspirando con dispositivos adecuados y **nunca** con la boca directamente.
12. Una vez que se han utilizado los bajalenguas y escobillones, se deben descartar en solución de hipoclorito diluido al 10 %.
13. Al terminar el período de trabajo en el laboratorio: apague el mechero, descarte el material contaminado en las bolsas o recipientes destinados para tal fin, coloque los materiales en su puesto y limpie su área de trabajo.

Higiene

- Los estudiantes con el cabello largo deben llevarlo recogido.
- Evitar el uso de joyas durante el trabajo.
- Comer, beber, fumar y aplicarse cosméticos está totalmente prohibido en el área de trabajo de laboratorio, así como el almacenamiento de comida o bebida.
- Los estudiantes deben lavarse las manos frecuentemente durante las actividades rutinarias, antes y después de terminar el laboratorio y siempre antes de abandonar el laboratorio. Se usará un jabón antiséptico y el secado se realizará con papel desechable.

1.3 Cabinas de seguridad biológica (CSB)

Son cámaras de circulación forzada que, según sus especificaciones y diseño, proporcionan diferentes niveles de protección. Son fundamentales en un laboratorio de microbiología y se clasifican según el nivel y tipo de protección (OMS, 2005; Lammert, 2007).

Es necesario distinguir entre las campanas de extracción de gases, las cabinas de flujo laminar y las cabinas de seguridad biológica.

La campana de gases o cabina extractora de gases es un recinto ventilado que captura los humos y vapores procedentes de la manipulación de los productos químicos en el laboratorio. Si bien constituye un equipo muy útil en la contención del riesgo químico, no ofrece protección alguna frente a riesgos biológicos.

Las cabinas de flujo laminar se dividen en Cabinas de Flujo Laminar Horizontal y Cabinas de Flujo Laminar Vertical, son recintos que emplean un ventilador para forzar el paso del aire en forma vertical u horizontal a través de un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air). Estas cabinas brindan un flujo de aire limpio y sin turbulencias sobre al material que se maneja en su interior, pero nunca al operador.

Las cabinas de seguridad biológica CSB son recintos ventilados diseñados para limitar al máximo el riesgo del personal de laboratorio expuesto a agentes infecciosos. Ello es especialmente importante si se tiene en cuenta que muchas de las operaciones realizadas en un laboratorio implican la formación de aerosoles. Estos equipos tienen como objetivo principal proporcionar una zona de trabajo que disminuya la probabilidad de que una partícula transportada por el aire pueda escapar hacia el exterior de la cabina y contaminar así al operario y a la zona que le rodea. Además, algunas de ellas ofrecen protección al material que se manipula.

Las CSB disponen de dos sistemas que impiden la salida de contaminación: las barreras de aire y los filtros.

Las barreras de aire se crean permitiendo que este fluya en una sola dirección y a una velocidad constante, dando lugar a una verdadera “cortina” de aire que se conoce como flujo de aire laminar. Es, por definición, un flujo con ausencia de turbulencias.

El aire en las CSB (la velocidad del flujo de aire es de unos 0,38-0,40 m/s de la sala) penetra por el área frontal, atraviesa la zona de trabajo y sale todo al exterior (conducto de extracción), pasando previamente por un filtro HEPA. *Los filtros* tienen como finalidad atrapar las partículas contenidas en este flujo de aire y los empleados habitualmente son los HEPA, que retienen con una eficacia del 99,97 % partículas de hasta 0,3 micras de diámetro y el 99,99 % de las partículas de tamaño mayor o menor.

Las CSB se dividen en tres categorías: **clase I, clase II y clase III.**

Cabinas de clase I. Son apropiadas para manipular agentes biológicos de los grupos 1 y 2. Su ventaja es que proporciona protección tanto personal como ambiental y puede utilizarse para trabajar con sustancias químicas tóxicas

volátiles, pero no previene la exposición por contacto a materiales peligrosos. La mayor desventaja que presentan es que no garantiza la protección, en caso de que se requiera, del producto manipulado. Se recomienda para estas cabinas velocidades de entrada de aire, para aberturas frontales no superiores a 20 cm, de 0,4 m/seg como mínimo y no superiores a 1 m/seg (velocidades superiores a 1 m/seg dan lugar a turbulencias y posibles retornos con lo que disminuiría el grado de protección proporcionado por la cabina). El sistema de filtración HEPA en la extracción, puede estar o no acoplado a un sistema de extracción conectado al exterior. (Figura 4).

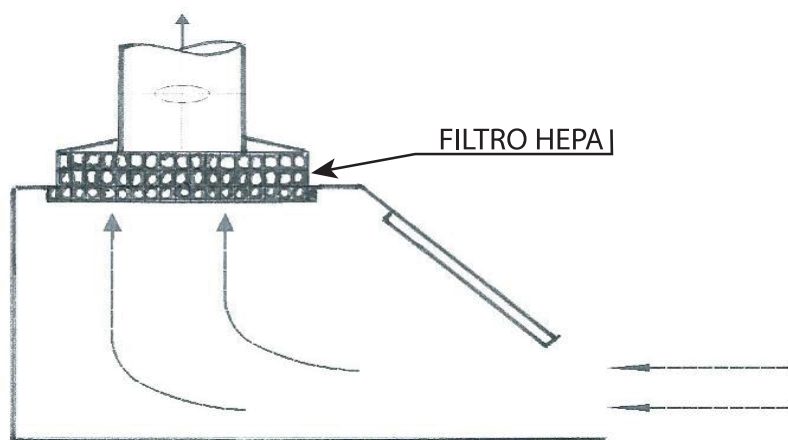


Figura 4. Cabina de bioseguridad clase I.

Fuente: Aura Lizarazo Forero

Cabinas de clase II. Son equipos válidos para el manejo de agentes biológicos de los grupos 1, 2, y en algunas ocasiones se incluyen el grupo 3, siempre que se utilicen trajes presurizados. Se diferencian principalmente de las de clase I en que, además de al operario y su entorno, ofrecen protección a la muestra frente a la contaminación. La superficie de trabajo está bañada por un flujo descendente de aire filtrado estéril (Flujo Laminar Vertical). La protección del trabajador se logra por la creación de una barrera de aire formada por la entrada de aire desde el ambiente, a través de la abertura frontal, y por el flujo descendente de aire filtrado estéril. El ventilador o ventiladores (algunas cabinas poseen un único ventilador para la extracción y la recirculación y otras, utilizan hasta tres ventiladores, dos para la recirculación y otro para la

extracción) fuerzan el paso del aire de la cabina y el que penetra por la abertura frontal, a través de rejillas situadas en la parte frontal y posterior del área de trabajo. Este aire es filtrado por un Filtro HEPA y reconducido a la parte superior de la cabina donde una parte del aire filtrado estéril es recirculado y otra parte es extraído a través de un sistema de filtración-purificación del aire, por otro ventilador que suele estar instalado en el exterior de la cabina. La ubicación de ventiladores y filtros debe asegurar que todas aquellas zonas del circuito de aire contaminado (no filtrado) se hallan a presión negativa, de modo que ante cualquier eventualidad el aire no pueda escapar al exterior de la cabina. El volumen de aire extraído es equivalente al tomado en la abertura frontal. (Figura 5).

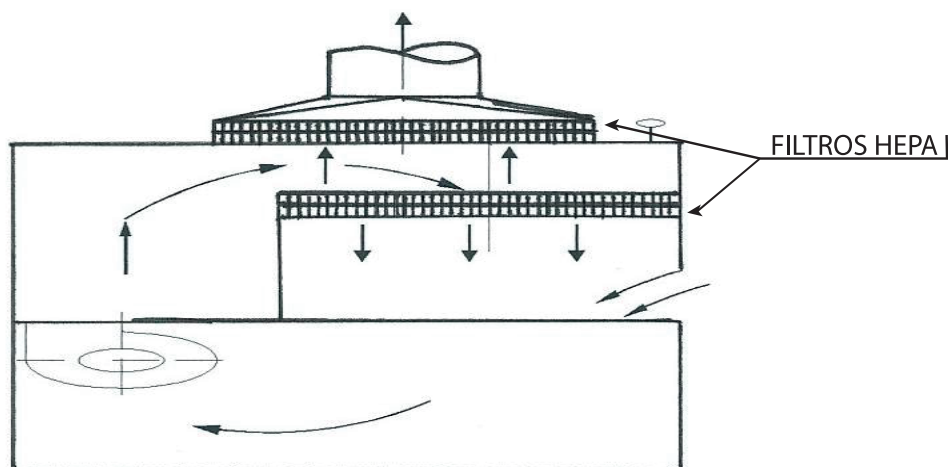


Figura 5. Cabina de bioseguridad clase II.

Fuente: Aura Lizarazo Forero

Existen varios tipos de cabinas de **clase II: A1, A2, B1, B2 y B3**, según sus características de construcción, aire recirculado, flujo de aire y sistema de extracción, velocidades de aire en la abertura frontal y sobre el área de trabajo.

Cabinas de clase III. Protección ofrecida al operador, al producto y al ambiente y se utilizan para trabajar con agentes del grupo de riesgo 3 y 4. Son recintos herméticos con presión negativa (alrededor 124,5 Pa) y, por ello, su interior está completamente aislado del entorno. Se opera en ellas por medio de unos guantes, con trampa para introducir el producto, el aire es tomado del exterior y filtrado a través de un filtro HEPA. En su extracción (100%), suele haber

dos filtros HEPA montados en serie para la completa purificación del aire extraído (Figura 6).

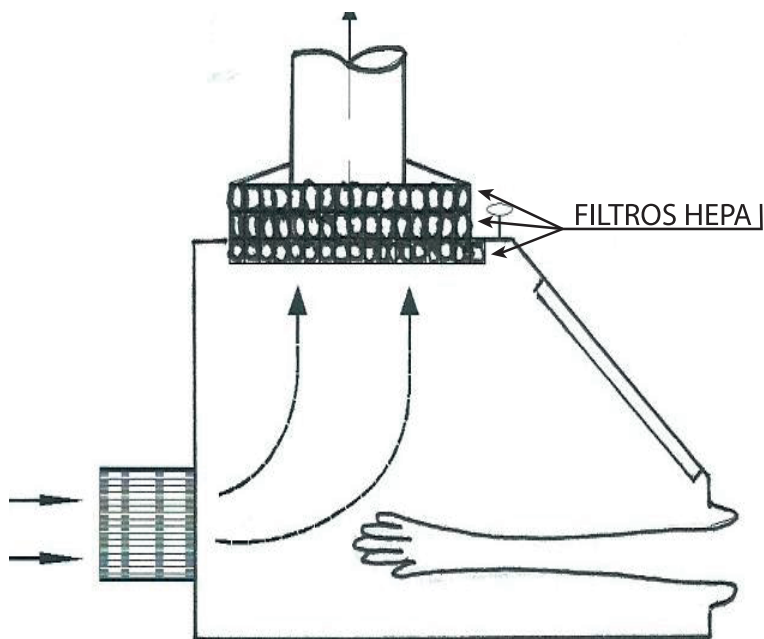


Figura 6. Cabina de bioseguridad clase III.

Fuente: Aura Lizarazo Forero

