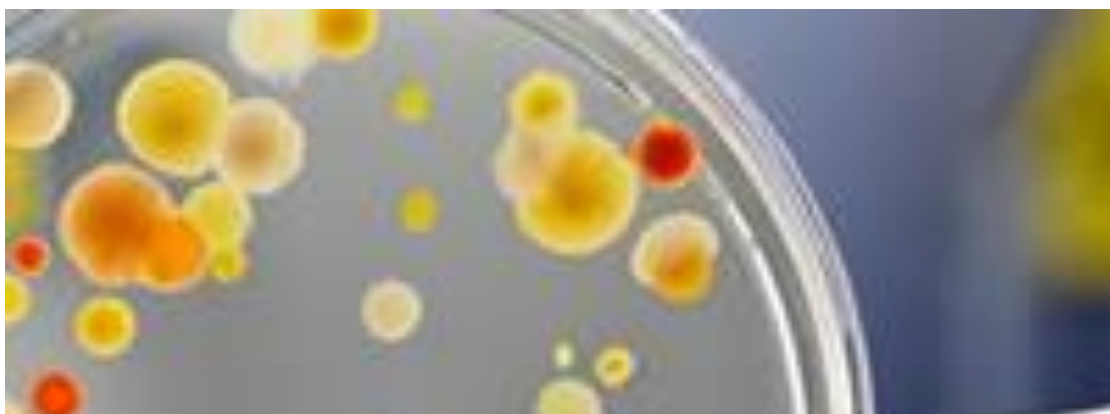




INTRODUCCIÓN AL TRABAJO DE
LABORATORIO EN
MICROBIOLOGÍA

MICROBIOLOGÍA
AMBIENTAL



INDICE

Introducción al trabajo de laboratorio en microbiología	1
Objetivos	2
Técnicas Básicas en el laboratorio de microbiología	3
Técnica aséptica	4
Soluciones decontaminantes, preparación y uso.	8
Hipoclorito de sodio	8
Protección personal	10
Lavado de manos:	10
Antisépticos:	11
El Iodo-povidona (IPV)	11
Como proceder ante un accidente en el laboratorio:	11
Elementos punzocortantes.	12
Disposición de material contaminado	12
Recomendaciones finales:	15
Bibliografía:	16
ANEXO: USO DE MICROPIPETAS	17

Objetivos:

Familiarizar al alumno con el material y las técnicas de uso común en el laboratorio de microbiología.

Difundir normas básicas de Bioseguridad.

Alertar al alumno sobre los riesgos que implica el trabajo en laboratorio.

Brindar al alumno conocimientos sobre las medidas apropiadas de prevención o de acción frente a accidentes en el laboratorio.

Introducción

La MICROBIOLOGÍA es la ciencia que se dedica al estudio de los microorganismos, estos forman un grupo muy extenso y diverso de organismos cuyo tamaño. La unidad de medida es el μm (micra o micrón).

La microbiología, como ciencia básica, investiga:

- Procesos vitales de los microorganismos:
 - ❖ Generación de energía.
 - ❖ Crecimiento.
 - ❖ Reproducción.
- La diversidad microbiana.
- La taxonomía microbiana.
- La evolución microbiana.

Como ciencia aplicada, se relaciona con otras ciencias (agricultura, medicina, industria alimentaria, biotecnología, ecología, etc) para estudiar la intervención de los microorganismos en los procesos de estas ciencias.

Los microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza en donde pueden crecer y reproducirse: suelo, agua, animales, plantas y seres humanos. Muchos microorganismos pueden transportarse a través del aire aunque en este medio no se reproducen.

El picaporte de una puerta, las manos, incluso los apuntes están cubiertos de microorganismos y pueden producir infecciones.

Si bien solo unos pocos microorganismos son capaces de producir enfermedades, algunas de estas son tan graves que justifican la preocupación y la necesidad de tener medidas preventivas para evitar infecciones.

Técnicas Básicas en el laboratorio de microbiología

Para estudiar los microorganismos en el laboratorio, se tiene que conseguir su crecimiento en cultivo puro, esto se logra al proporcionarles nutrientes, a través de los medios de cultivos, y las condiciones ambientales (pH, T°, O₂, Eh°, etc) que requieren, para que puedan desarrollarse.

Se debe evitar que microorganismos del ambiente se introduzcan en nuestros cultivos y los contaminen y que los microorganismos presentes en las muestras nos contaminen. Por ello, en microbiología se trabaja con elementos estériles y en condiciones de asepsia.

La esterilización, es la eliminación de todos los microorganismos presentes en una sustancia u objeto, y es un pre-requisito para poder estudiar, conservar y transportar cultivos microbianos puros.

Técnica aséptica

La técnica usada para evitar la contaminación durante la manipulación de cultivos microbianos, se denomina técnica aséptica.

Esta técnica, requiere:

- Un laboratorio ordenado y limpio.
- Trabajar con calma y concentración, procurando no distraer al resto de las personas que trabajan en el laboratorio.
- La siembra, el aislamiento, los repiques o transferencias de cultivos microbianos se realizan con elementos (ansas, agujas o ganchos) estériles.
- Trabajar a una distancia no mayor de 15 cm de la llama de un mechero Bunsen (Figura 1 a y b).

El ansa (Figura 1 c) es un elemento de metal, que resiste la esterilización, por flameado directamente sobre la llama del mechero; y la espátula de Drigalsky es de vidrio y se esteriliza en alcohol (se verá en el práctico de recuento).

Los mecheros Bunsen tienen un regulador de la entrada de aire, con el que hay que obtener una mezcla aire-gas de forma que la llama tenga la temperatura suficiente sin ser visible. Las llamas “frías” son anaranjadas, luminosas pero no esterilizan suficientemente, las llamas muy “calientes” son de un azul prácticamente invisible, lo cual supone un riesgo si no se trabaja con cuidado.

El suministro de gas para los mecheros requiere tomar precauciones propias de estas instalaciones (evitar la cercanía de sustancia inflamable, revisar periódicamente las conducciones, etc.) y cerrar todas las llaves de paso al finalizar el trabajo.



Fig. 1 a - Llama correcta para el trabajo en microbiología



Fig. 1 b - Llama fría, incorrecta para el trabajo en microbiología



Fig. 1 c - Ansas: gancho para trabajo en micología, ansa para aislamientos y ansa para punción.

Cuando se abren los recipientes (tubos o placas de Petri) que contienen medios de cultivo estériles, es decir, exentos de cualquier tipo de microorganismo viviente, deben manejarse de tal forma que no penetre el aire contaminado:

Esto se logra manteniendo los recipientes a un ángulo tal que la abertura no quede expuesta al aire, siempre trabajando en las cercanías del mechero Bunsen, como máximo 15 cm., con movimientos pausados y al abrigo de corrientes de aire.

En la figura 2 se observa el modo correcto de manipular las placas estériles, evitando corrientes de aire. Se debe trabajar con las ventanas cerradas y evitar desplazamientos innecesarios.

Las corrientes de aire se generan por ventanas o puertas abiertas, desplazamientos innecesarios por el laboratorio, etc.

Operaciones como: el centrifugado de muestras, vertidos rápidos (pipeteos, trasvases, etc.), incluso el manejo rápido del ansa de siembra, realizadas en forma brusca, pueden generar aerosoles que contienen microorganismos, siendo este uno de los riesgos principales, ya que pueden ser fácilmente inhalados.

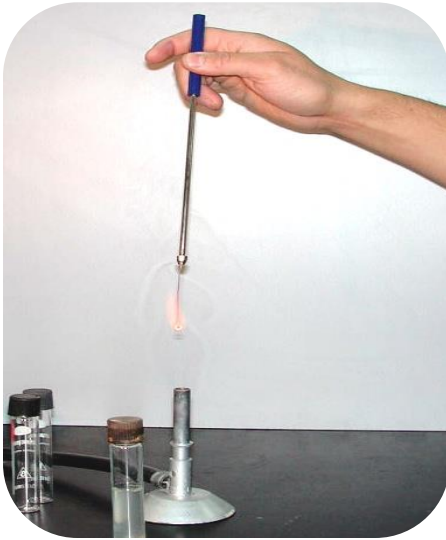


Fig. 2 a – Forma de esterilizar el ansa



Fig. 2 b - Trabajo en forma estéril, a no más de 15 cm del mechero.



Fig. 2 c – Transferencia desde un cultivo líquido



Fig. 2 d – Aislamiento en medio de cultivo sólido

Bioseguridad

El trabajo de laboratorio nos expone a una serie de riesgos adicionales a los existentes en cualquier otro trabajo (traumatismos, heridas, incendios, etc.).



Nos referiremos, en particular, al riesgo biológico, que es aquel dónde el agente capaz de producir daño es un ser vivo: bacteria, hongo, parásito o virus.

El conjunto de medidas, normas y procedimientos destinados a controlar y minimizar los riesgos biológicos es la **BIOSEGURIDAD**, tener presente que “el riesgo cero no existe”.

1º Regla DE ORO de la Bioseguridad, es la llamada “**Regla de los cuatro NO**”:

**-NO FUMAR
-NO COMER
-NO BEBER
-NO MAQUILLARSE**

A lo que se debe agregar **NO UTILIZAR EL CELULAR Y NO PIPETEAR** con la boca. Para evitarlo, existen dispositivos como: dispensadores, peras de goma y pipetas automáticas. (Ver ANEXO: Uso de micropipetas).

Aunque los microorganismos que se manipulen no sean considerados patógenos, TODOS los cultivos de TODOS los microorganismos deben ser manejados con precaución por su **potencial patogenicidad**.

2º Regla DE ORO es:

**CONSIDERAR QUE TODAS LAS MUESTRAS SON
PELIGROSAS Y TRATARLAS COMO TAL**

Soluciones decontaminantes, preparación y uso

Los desinfectantes químicos se utilizan para decontaminar o desinfectar, superficies, ambientes y material de laboratorio que no resista la esterilización en autoclave o por calor seco.

Hipoclorito de sodio

El decontaminante más usado en procesos de higiene y desinfección biomédicos es la lavandina, nombre común del hipoclorito de sodio, un agente químico que es capaz de eliminar a la mayoría de los microorganismos.

Al diluir la lavandina en agua, se genera el principio activo, el **ácido hipocloroso**, en un equilibrio que depende del pH:



Mecanismo de acción

Oxida en forma irreversible grupos -S-S- de ciertas enzimas vitales para los microorganismos, inactivándolas.

El HClO reacciona con casi cualquier molécula, consumiéndose, es decir, la solución se agota en su principio activo a medida que actúa, por esto hay que adecuar la relación entre agente decontaminante y material contaminado.

Para un buen proceso de decontaminación también es necesario utilizar el producto químico con una concentración y tiempo de contacto adecuados.

USO CORRECTO DE LA LAVANDINA

CONCENTRACIÓN	1%	10%
USO	Limpieza de superficies poco contaminadas: mesadas, pisos, paredes, etc.	Decontaminar material de laboratorio muy contaminado: jeringas, tubos, superficies contaminadas, cultivos, etc.
PREPARACIÓN	$1\% = 1/100 = 1 + 99$ Partiendo de la solución comercial (55 g/l de cloro activado), tomar 1 ml y llevar a 100 con agua corriente fría.	$10\% = 1/10 = 1 + 9$ Partiendo de la solución comercial, tomar 10 ml y llevar a 100 con agua corriente fría. En caso de usar, elementos no volumétricos (vaso), se agrega una parte de lavandina concentrada más 9 partes de agua.
	El volumen a preparar dependerá de la cantidad de material o la superficie a decontaminar.	
TIEMPO	30 min	30 min a 24 Hs.

PRECAUCIONES

Lavandina Diluida	Lavandina Concentrada
• NO usar agua caliente para las diluciones. • Las soluciones deben prepararse en el día y no usarse más allá de las 24 Hs de su preparación. • NUNCA mezclar con detergentes ni con compuestos ácidos, pues al combinarse se descompone el HClO, perdiendo la acción germicida. • NO usar para decontaminar equipos metálicos, las soluciones de lavandina son corrosivas. • NO agotar el principio activo por exceso de material. • ASEGURAR el contacto íntimo entre el material y la solución, por ejemplo en el caso de jeringas y tubos.	• Mantener en su envase original bien tapado • Conservar en lugar fresco y oscuro, pues el paso del tiempo, la luz y las altas temperaturas inactivan al hipoclorito.

Antes de comenzar el trabajo de laboratorio en microbiología, se prepararán las soluciones decontaminantes necesarias. La superficie de trabajo debe estar limpia para ser decontaminada con solución de lavandina al 1%.

Las mesadas deben estar libres de elementos innecesarios, por esto, la ropa de abrigo, bolsos, carpetas, etc, deben permanecer **SIEMPRE** fuera del ambiente de trabajo, evitando también el “transporte” de agentes biológicos del laboratorio al exterior del mismo.

Protección personal

***GUARDAPOLVO,
GUANTES, GAFAS
PROTECTORAS,
BARBIJO, ETC.***

Se denominan en conjunto, “equipo de protección personal”, protegen de derrames, salpicaduras y aerosoles. El guardapolvo debe usarse abotonado y cubriendo antebrazos, higienizarse periódicamente y permanecer dentro del laboratorio, evitando el contacto con la ropa de calle.

Las manos, blanco más común de heridas y pinchazos, se protegerán con guantes; se debe comprobar siempre, que estos no tengan perforaciones.

El uso de guantes protege al usuario, una vez colocados los guantes, se deberá abstenerse de tocar el propio rostro o bien otros elementos de uso común con la mano enguantada.

Lavado de manos

El lavado de manos al iniciar y terminar cada trabajo práctico, es **OBLIGATORIO** e independiente del uso de guantes. Es conveniente usar jabones líquidos o bien pastillas de pequeño tamaño y enjuagar con abundante agua. Eventualmente será necesario el uso de soluciones desinfectantes.

Después de finalizar el trabajo, decontaminar los guantes con solución de lavandina al 1%, o bien descartarlos en el lugar que corresponda (cesto de residuos biopatológicos).

Antisépticos

Los agentes usados como **ANTISÉPTICOS** (desinfectantes que pueden aplicarse sobre piel y tejidos vivos) son comúnmente sustancias iodadas. Como el yodo puede producir irritación, tinción o reacciones alérgicas, las formulaciones comerciales poseen un carrier, generalmente povidona, que lo libera gradualmente y evita estos efectos indeseables.

iodo-povidona (IPV)

Puede usarse en solución acuosa, tiene la ventaja de sumar la acción surfactante al poder germicida del yodo. Generalmente está formulado al 10% (1% de yoduro) y se utiliza diluido al 2,5% IPV:

Para realizar la dilución se toma 1 parte solución IPV (10%) + 3 partes de agua hirviendo → Dejar Enfriar → Envasar → Utilizar

Debe ser diluido en la concentración indicada debido a que su acción estará notablemente disminuida si las concentraciones son altas.

Otra sustancia muy utilizada es el **ALCOHOL ETÍLICO o ETANOL**, el cual presenta su mayor eficiencia como antiséptico al 70%. Existen formulaciones en gel muy prácticas para el laboratorio.

Como proceder ante un accidente en el laboratorio

Si ocurriese un derrame accidental o la rotura de recipiente que contenga bacterias/virus/hongos, sea material infeccioso o no. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- 1) Avisar inmediatamente al responsable del laboratorio (docente, en este caso).
- 2) El derrame se cubrirá con algodón o papel absorbente embebidos en solución de lavandina al 10%, durante al menos 30 min.
- 3) Se recoge el material usado como absorbente y se transporta al recipiente para residuos patológicos.

Todo el procedimiento se efectuará con equipo de protección personal.

Elementos punzocortantes

Las agujas deben colocarse en descartadores de agujas, recipientes de plástico rígidos que contiene solución de lavandina al 10%.

NUNCA intentar doblar o romper una aguja.

NUNCA separarlas de la jeringa.

NUNCA envainar con su capuchón plástico, ésta es una de las prácticas más inseguras que se conocen.

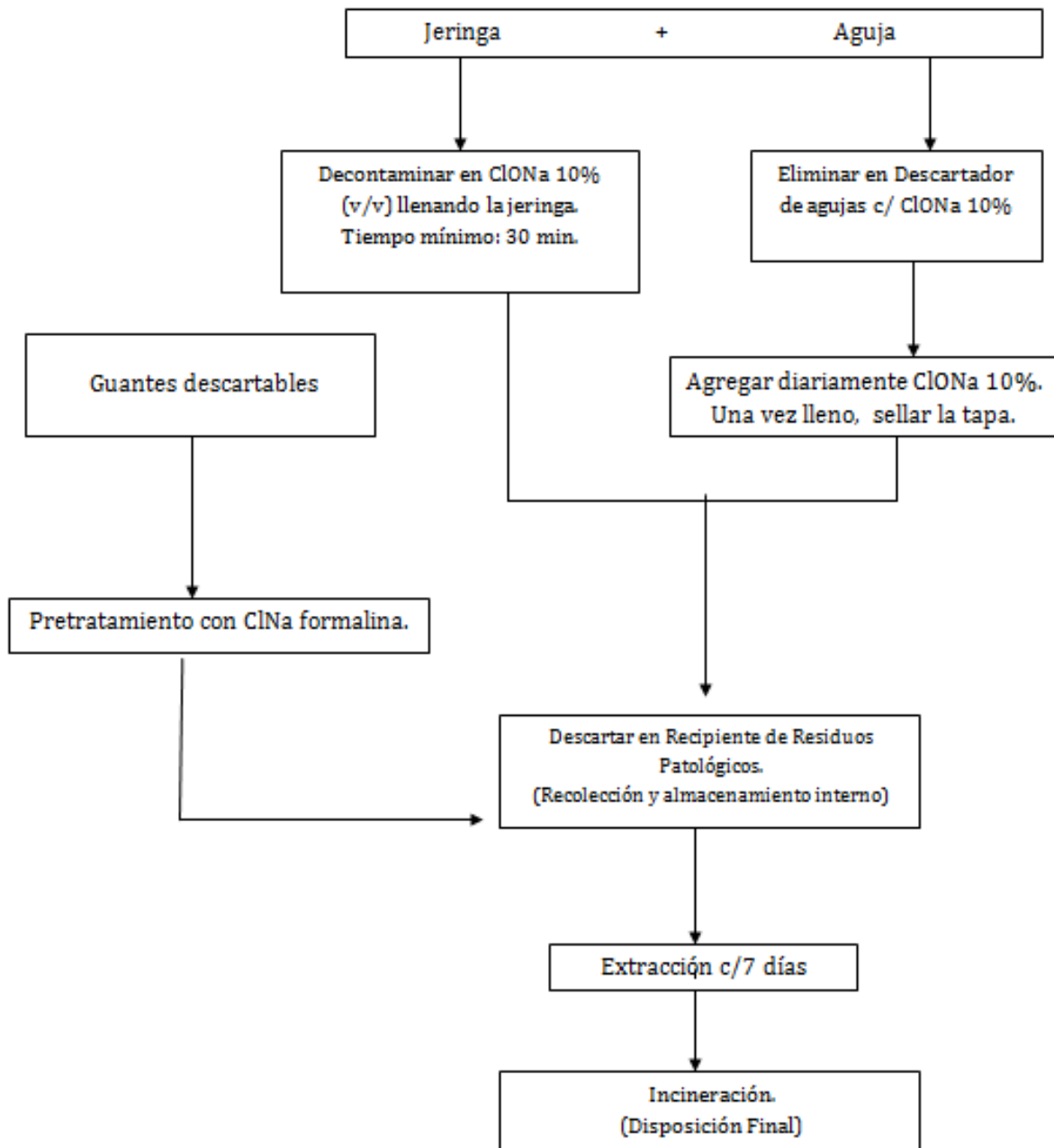
Disposición de material contaminado

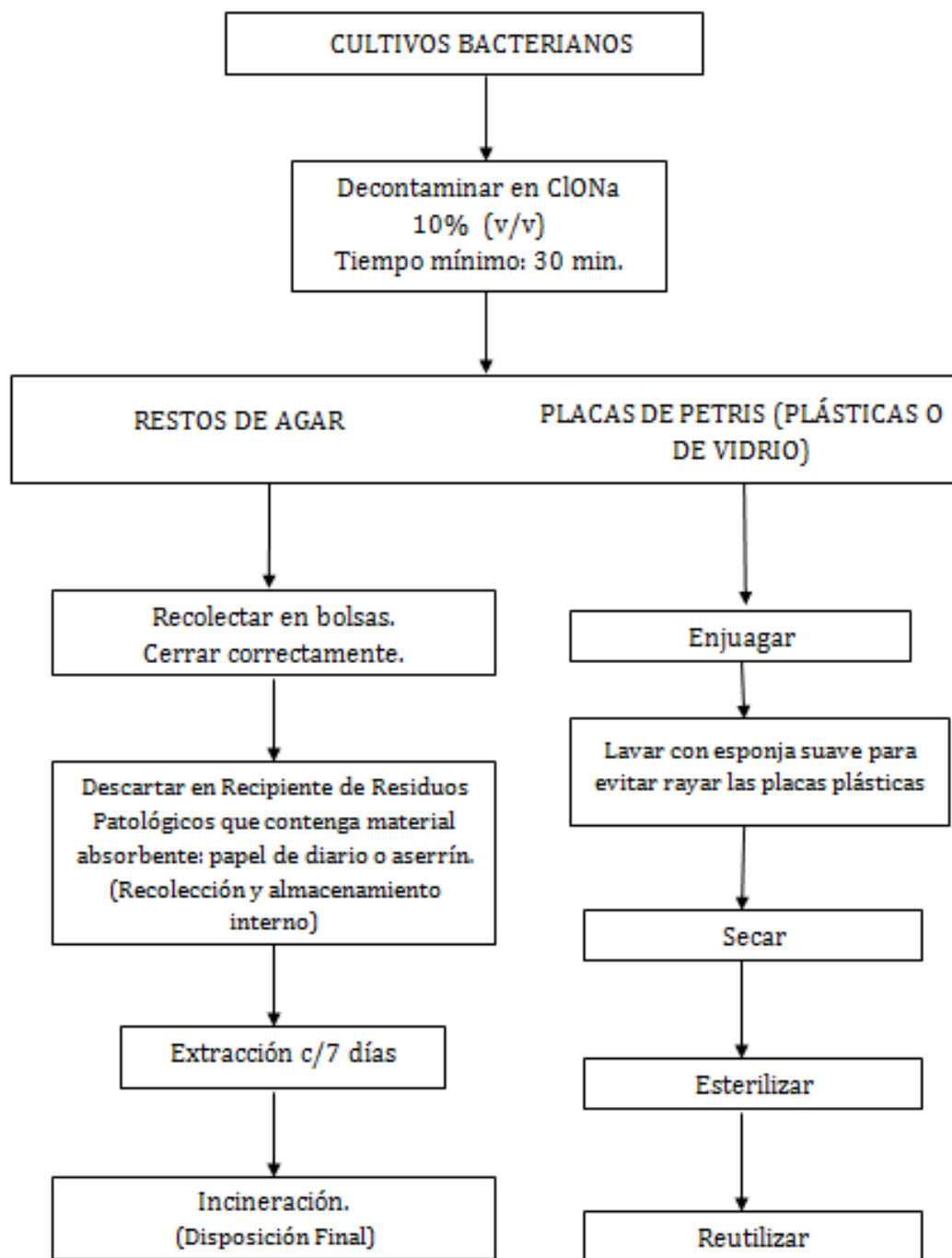
Como generadores de residuos biopatológicos, una clase de residuo peligroso contemplada en la Ley Nacional N° 24051, se tiene la responsabilidad de tratarlos para minimizar o eliminar el riesgo biológico que poseen, antes de su disposición final.

Durante los trabajos prácticos de microbiología generaremos: guantes descartables, agujas, jeringas, y cultivos bacterianos. Por esto se diseñaron los siguientes esquemas que plantean el camino a seguir en cada caso.

En resumen puede expresarse que:

- Los materiales descartables se colocan en bolsas plásticas, dentro del recipiente para residuos patológicos.
- Todo elemento no descartable, deberá ser decontaminado con solución de lavandina al 10% durante al menos 30 min, para luego ser esterilizado y reutilizado.
- Todos los elementos punzocortantes deben colocarse en recipientes plásticos rígidos rotulados como material contaminado.





Recomendaciones Finales

Es muy recomendable tener un Kit personal para el trabajo de laboratorio formado por:

***GUARDAPOLVO
GUANTES
LIBRETA O CUADERNO DE APUNTES
ENCENDEDOR
MARCADOR INDELEBLE
CRONÓMETRO/RELOJ POR GRUPO***

RECORDAR SIEMPRE identificar en el ámbito de trabajo:

- Botiquín de primeros auxilios.
- Interruptores de corriente eléctrica.
- Matafuegos.
- Piletas
- Recipientes para residuos comunes y para residuos biopatológicos.

La mayor defensa de nuestra vida depende de **NOSOTROS**.

Los buenos hábitos, el respeto por las normas de Bioseguridad y el conocimiento de “dónde” reside el peligro, nos permitirá reducir la probabilidad de sufrir accidentes, cuidándonos a nosotros y quienes nos rodean.

Bibliografía

- Seguridad en el manejo de Químicos. Manual elaborado por la gerencia de protección de riesgos. La caja de ahorro y seguro. 1998.
 - Manual de Bioseguridad. CA.DI.ME. 1994.
 - Manual de Bioseguridad para técnicos de Laboratorio. Asociación Argentina de Microbiología. 1992.
 - Microbiología. Brock T. Madigan M. 6° ed.1991.
 - Desinfección. Desinfectantes, desinfectantes, limpieza.
Miguel D`Aquino. Roberto Rezk. Cap 5. Agentes oxidantes. EUDEBA
 - Cap 1. Introducción la trabajo de laboratorio en microbiología.
 - J.A. Bongochea, V. Aragón, J. López Goñi.
-

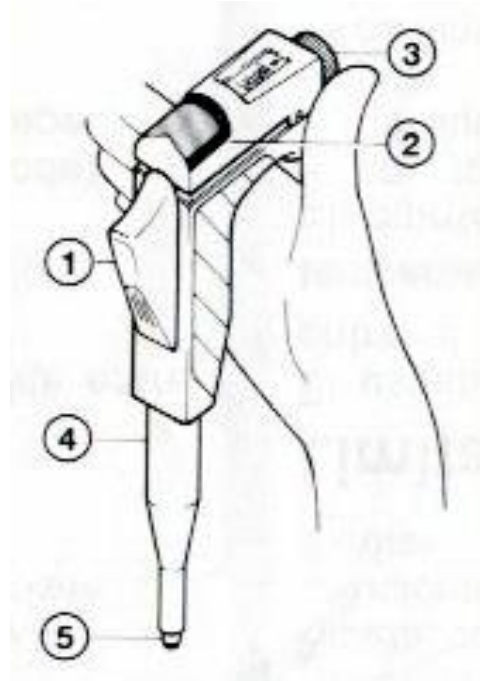
ANEXO: USO DE MICROPIPETAS

Una micropipeta es un dispositivo mecánico para pipetear pequeños volúmenes con exactitud.

Descripción

Se distingue:

1. Mando de pipeteado
2. Expulsor
3. Ajuste de volumen
4. Vástago
5. Cono de acoplamiento



Se complementa con una punta o TIP recambiable. Estas puntas son de plástico resistente al autoclavado (esterilización por calor húmedo), se colocan en soportes o frascos para su esterilización. Vienen en 2 colores, en función de su capacidad:

Color	Volumen
Amarillo/blanco	$\leq 200\mu\text{l}$
Celeste/azul	$\leq 1\text{ ml}$

Manejo:**A. Colocación de la punta:**

- Abrir el frasco a una distancia de 15 cm del mechero.
- Introducir la micropipeta en el frasco y calzar el tip en el cono de acoplamiento.
- **NO** intentar sacar los tips con las manos.
- Una vez calzado, girar ligeramente en sentido antihorario para ajustarlo.
- Cerrar el frasco, **NUNCA** dejarlo destapado
- Los tips **NO** deben flamearse

B. Pipetear:

- Una vez ajustada la punta, coloque el pulgar sobre el mando de pipeteado, este posee dos topes, IDENTIFIQUELOS!!
- Llenado de la muestra: Oprimir el mando de pipeteado hasta el primer tope.

- Sumergir la punta unos 2 -3 mm en la muestra.
- Soltar **LENTAMENTE** el mando de pipeteado.
- Dejar la punta en el líquido aproximadamente 1 seg para evitar que se aspire aire.
- **ATENCIÓN!** No colocar **NUNCA** el aparato con la punta llena en posición horizontal. Expulsor

C. Expulsión de la muestra:

- Apoyar el tip en la pared del recipiente.
- Apretar hasta el segundo tope para vaciar completamente.
- Escurrir la punta en las paredes del recipiente.
- Dejar retroceder el mando.
- Si la muestra es pequeña enjuagar el tip, un par de veces en el recipiente

D. Expulsión del tip:

- En un recipiente apropiado para descartar los tips, llevar la micropipeta y apretar el expulsor, el cual sacara el tip del cono de acoplamiento.



Fig. 3 a – Expulsión de la muestra.



Fig. 3 b – Distintos tipos de micropipetas