

IPP

Instituto Profesional Providencia

Miembro de:



LIBRO DE TEXTO CIENCIAS **MICROBIOLOGÍA**

Autor/Compilador:

Claudia Núñez González

PhD. Biomedicina, Universidad de Alcalá, España

Producto realizado con fondos públicos de proyecto FIAC-MECESUP 1102 ejecutado por el Instituto Profesional Providencia (www.ipp.cl)



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

Tabla de contenido

MICROBIOLOGÍA.....	4
HISTORIA DE LA MICROBIOLOGÍA.....	5
CÉLULAS PROCARIOTAS	9
VIRUS	13
Virus ADN	14
Virus ADN bicatenario	14
Virus ADN monocatenario.....	14
Virus ARN.....	15
Virus ARN bicatenario	15
Virus ARN monocatenario positivo	15
Virus ARN monocatenario negativo	16
Virus ARN monocatenario retrotranscrito.....	16
Virus ADN bicatenario retrotranscrito	16
Clasificación Baltimore.	17
VIROIDES	18
PRIONES	18
BIOSEGURIDAD	20
MEDIDAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO	21
REGLAS GENERALES PARA EVITAR RIESGOS.....	22
CLASIFICACIÓN DE RIESGO Y DE LOS LABORATORIOS DE TRABAJO BIOLÓGICO.....	22
BARRERAS DE CONTENCIÓN.....	24
A) Bioseguridad en el manejo de microorganismos patógenos:.....	27
B) Bioseguridad en el manejo de microorganismos patógenos de plantas:	28
C) Bioseguridad en el manejo de los virus	28
D) Bioseguridad en las investigaciones que hacen uso de moléculas de DNA recombinante.	29
ESTERILIZACION.....	32
CLASIFICACION DE LOS METODOS DE ESTERILIZACION	32
MANEJO DEL AUTOCLAVE.....	36
CONTROL DE ESTERILIZACIÓN.....	37
MATERIAL CORTO PUNZANTE	39
LIMPIEZA	40
LAVADO DE MANOS	41
MEDIOS DE CULTIVO.....	45
CONDICIONES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	45
UTILIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	46
CLASIFICACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO:.....	46
OBTENCION DE CULTIVOS PUROS: SIEMBRA Y AISLAMIENTO.....	52
EXAMEN MICROSCÓPICO DE BACTERIAS.....	56

MORFOLOGIA BACTERIANA.....	63
ANTIBIOTICOS Y ANTIBIOGRAMA	66
ANTIBIOTICOS	66
ANTIMICROBIANOS.....	67
MECANISMOS DE ACCION DE LOS ANTIBIOTICOS	67
ANTIBIOGRAMA.....	69
MICOLOGIA	74
CLASIFICACION TAXONOMICA	75
MORFOLOGIA GENERAL DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS	76
IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS.....	77
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	80

MICROBIOLOGÍA

La palabra microbiología deriva de tres palabras de raíz griega, *mikro* que significa muy pequeño, *bios* = vida, *logos* = estudio. Por lo tanto la microbiología se puede definir como la ciencia que estudia los organismos cuyo tamaño es inferior al poder de resolución del ojo humano, es decir organismos que no se pueden ver a ojo desnudo o simple vista. En este grupo se consideran a las bacterias, hongos, virus y protozoos (Figura 1). La microbiología estudia la estructura, fisiología, ecología, genética y las aplicaciones de estos microorganismos. Si bien es cierto los virus poseen características distintas a las células, también son estudiados por la microbiología.

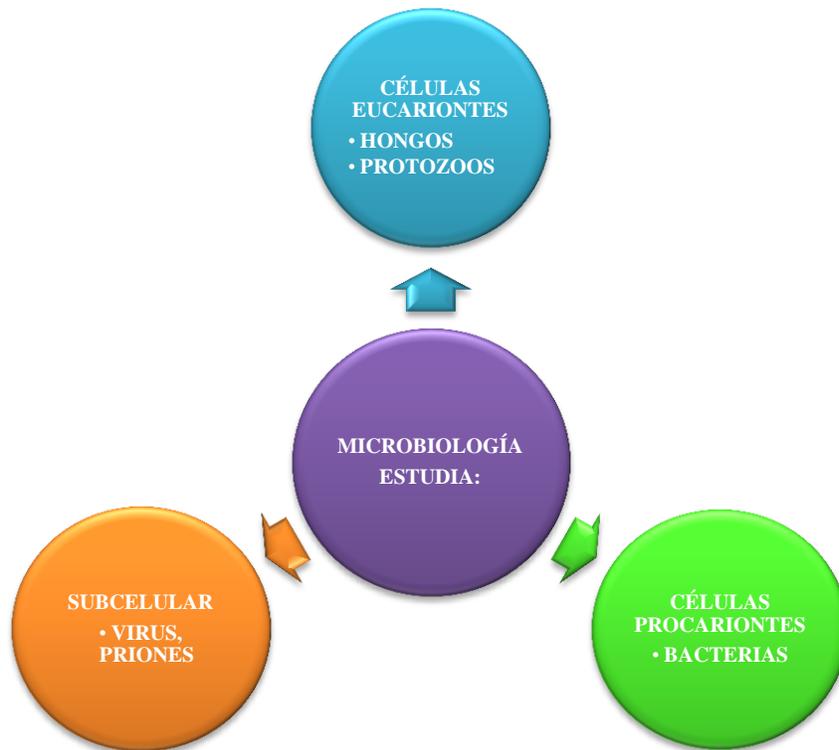


Figura 1. Áreas de estudio de la Microbiología.

HISTORIA DE LA MICROBIOLOGÍA

La historia de la microbiología y sus aplicaciones se remontan a cientos de años, tiempo en el cual ocurrieron muchos eventos que marcaron el desarrollo de la microbiología, algunas personas que participaron en hechos importantes son:

Francisco Redi (1626-1698).

Naturalista y fisiólogo italiano. En una época en la cual se creía en la generación espontánea, Redi era uno de los detractores. Demostró que los insectos no nacen por generación espontánea, comprobando que los gusanos no se desarrollaban espontáneamente de la carne descompuesta, sino que las moscas depositaban sus huevos sobre ésta y de esa manera se producía el desarrollo de los “gusanos”.

Anton van Leeuwenhoek (1632-1723).

Se destacó por construir microscopios simples con lentes que proporcionaron un poder de resolución mayor que los existentes en esa época, lo cual le permitió realizar las primeras descripciones exactas de la mayoría de los microorganismos unicelulares.

Lazzaro Spallanzani (1729-1799).

Biólogo italiano, considerado uno de los fundadores de la biología experimental quien demostró que calentando las infusiones bajo condiciones controladas se previene la aparición de vida microscópica.

Louis Pasteur (1822-1895).

Químico y bacteriólogo francés, cuyas contribuciones a la ciencia fueron numerosas. Logró explicar la acción general de los microorganismos, realizó diversas investigaciones sobre las fermentaciones (láctica, alcohólica, butírica). Postuló y demostró la existencia de los gérmenes, con estos estudios logra argumentos en contra de la teoría de la generación espontánea. Desarrolló una vacuna contra el carbunco y posteriormente una vacuna contra la rabia entre otras grandes contribuciones.

Schroeder y Von Dusch.

En 1853 descubrieron que después de hervir una infusión de carne y cerrar los frascos con tapones de algodón se impedía la entrada de microorganismos. Introdujeron el uso del tapón de algodón, que se usa todavía para impedir la entrada de microorganismos del aire a tubos.

Teoría Microbiana de las enfermedades.

G. Fracastorus (1483-1553) sugirió que las enfermedades podían deberse a organismos invisibles transmitidos de una persona a otra.

Berkeley (1845) demostró que un mohó era el causante del tizón de la papa de Irlanda.

I. Semmelweis (1818-1865), obstetra húngaro que a mediados del siglo XIX descubrió la naturaleza infecciosa de la fiebre puerpural, logrando controlar su aparición con una medida de antisepsia.

R. Koch (1843-1910) Médico alemán. Descubrió el agente causal del carbunco, el bacilo causante de la tuberculosis, y el vibrión causante del cólera. Con sus notables trabajos sentó las bases de la teoría microbiana de las enfermedades y formuló los Postulados de Koch, en los cuáles se establecen las condiciones que debe reunir un microorganismo para ser considerado como agente causal. Los postulados son los siguientes:

Postulado 1

El microorganismo patógeno sospechoso debe estar presente en todos los casos de la enfermedad y ausente de animales sanos.

Postulado 2

El microorganismo debe ser aislado y cultivado en forma pura (cultivo puro) en el laboratorio.

Postulado 3

La inoculación de animales susceptibles con ese cultivo puro, debe causarles la enfermedad.

Postulado 4

El microorganismo debe ser reaislado de esos animales y cultivado en forma pura en el laboratorio, después de lo cual debe ser el mismo que el microorganismo original.

A finales del siglo XIX ya se sabía que las bacterias causaban muchas enfermedades, no existían tratamientos antibacterianos para combatirlos. En 1910, Paul Ehrlich desarrolló el primer antibiótico, por medio de unos colorantes capaces de teñir y matar selectivamente a las espiroquetas de la especie *Treponema pallidum*, la bacteria causante de la sífilis. Erlich recibió el premio Nobel en 1908 por sus trabajos en el campo de la inmunología y por ser pionero en el uso de colorantes para detectar e identificar bacterias, base fundamental de las posteriores tinciones de Gram y tinción de Ziehl Neelsen.

Un gran avance en el estudio de la clasificación de las bacterias fue el descubrimiento realizado por Carl Woese en 1977, quien demostró que las arqueobacterias presentan una línea evolutiva diferente a las bacterias. Esta nueva taxonomía filogenética se basaba en la secuenciación del ARN ribosómico 16S y dividía a los procariotas en dos grupos evolutivos diferentes, en un sistema de tres dominios: Arquea, Bacteria y Eukarya.

Los seres vivos se dividen actualmente en tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya. En los dominios Archaea y Bacteria se incluyen los organismos procariotas, esto es, aquellos cuyas células no tienen un núcleo celular diferenciado, mientras que en el dominio Eukarya se incluyen las formas de vida más conocidas y complejas (protistas, animales, hongos y plantas) (Figura 2).

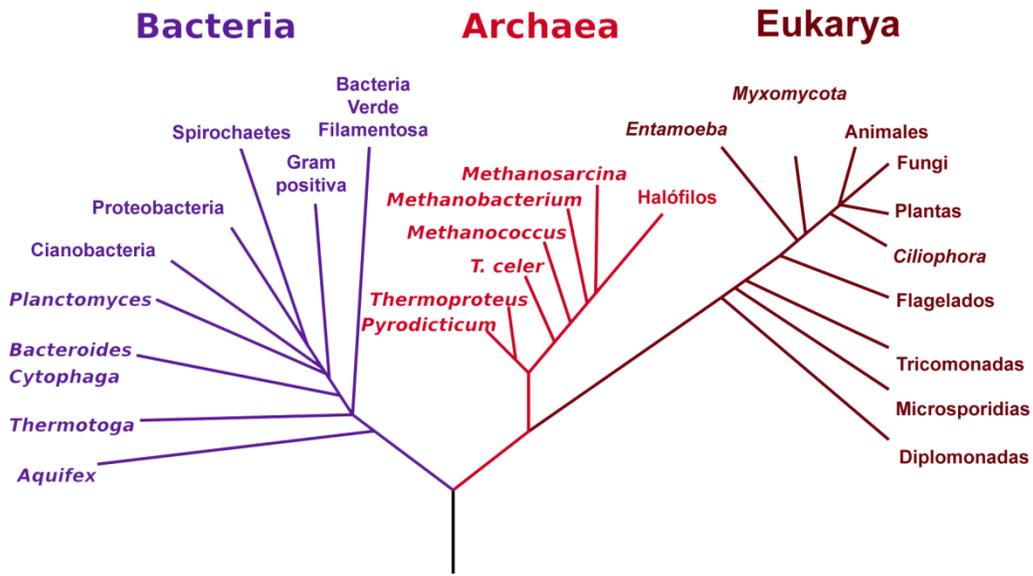


Figura 2. Árbol filogenético de la vida. Dominios Bacteria, Archaea y Eucarya.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phylogenetic_tree_es.svg

CÉLULAS PROCARIOTAS

Las células procariotas son unicelulares, es decir formados por una sola célula. Se llama procariotas (del griego πρό, pro = antes de y κάρυον, karion = núcleo) a las células sin núcleo celular diferenciado, es decir cuyo material genético se encuentra disperso en el citoplasma, ubicado en una zona denominada "nucleoide", el material genético es conformado ADN circular de doble hebra. En el citoplasma se encuentran plásmidos que son pequeñas moléculas de ADN circular que contienen genes que confieren resistencia a los antibióticos. El metabolismo de los procariotas es enormemente variado, a diferencia de los eucariotas, y muchos resisten condiciones ambientales extremas en temperatura o acidez.

Su tamaño es pequeño (menos de 5 micras de largo), con una estructura interna en la cual no hay presencia de organelos membranosos. En su mayoría están rodeadas por una pared celular relativamente rígida compuesta por peptidoglicano, que confiere forma y protege a la célula bacteriana. Algunas bacterias presentan una cápsula y otras son capaces de desarrollarse como endosporas, estados latentes capaces de resistir condiciones extremas. Entre las estructuras externas propias de la célula bacteriana destacan los flagelos, los pili y fimbrias. Los flagelos son estructuras largas filamentosas, compuestos de proteínas y utilizados para el movimiento, tienen un diámetro aproximado de 20 nm y una longitud de hasta 20 μm . Los flagelos son impulsados por la energía obtenida de la transferencia de iones dada por el gradiente electroquímico que existe entre ambos lados de la membrana citoplasmática. Las fimbrias son filamentos finos de proteínas que se distribuyen sobre la superficie de la célula, tienen un diámetro aproximado de 2-10 nm y una longitud de hasta varios μm . Las fimbrias ayudan a la adherencia de las bacterias a las superficies sólidas o a otras células y son esenciales en la virulencia de algunos patógenos. Los pili son apéndices celulares ligeramente mayores que las fimbrias y se utilizan para la transferencia de material genético entre bacterias en un proceso denominado conjugación bacteriana.

Además contienen ribosomas para la síntesis de proteínas, pero éstos son diferentes a los ribosomas de las células eucariontes. La estructura de los ribosomas y el ARN ribosomal de las células procariontes son de tipo 70S mientras que los ribosomas eucariotas son de tipo 80S.

Algunas bacterias presentan inclusiones citoplasmáticas para el almacenaje de sustancias, como por ejemplo glucógeno, polifosfatos, azufre entre otros (Figura 3).

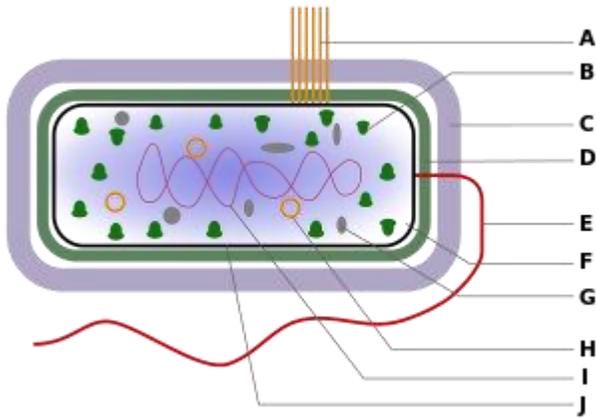


Figura 3. Estructura general de célula procariote. A: Pili; B: Ribosomas; C: Cápsula; D: Pared celular; E: Flagelo; F: Citoplasma; G: Inclusiones citoplasmáticas; H: Plásmido; I: ADN cromosómico; J: Membrana plasmática. <http://conabio.inaturalist.org/taxa/67333-Bacteria>.

La membrana plasmática bacteriana tiene una estructura similar a la membrana de células eucariontes, consiste en una bicapa lipídica con proteínas insertas y periféricas, y que a diferencia de las membranas de células eucariontes, generalmente no contiene esteroides (son excepciones micoplasmas y algunas proteobacterias). La membrana plasmática tiene varias funciones como por ejemplo transporte, biosíntesis, transducción de energía, centro de replicación de ADN entre otras, la ausencia de membranas internas implica que las reacciones tienen que producirse a través de la propia membrana citoplasmática, entre el citoplasma y espacio periplásmico.

La forma de las bacterias es muy variada, en ocasiones una misma especie adopta distintos tipos morfológicos, lo que se conoce como pleomorfismo. En general se distinguen tres tipos fundamentales de bacterias (Figura 4):

- a) Cocco (del griego kókkos, grano): de forma esférica.
 - Diplococo: cocos en grupos de dos.

- Tetracoco: cocos en grupos de cuatro.
 - Estreptococo: cocos en cadenas.
 - Estafilococo: cocos en agrupaciones irregulares o en racimo.
- b) Bacilo (del latín baculus, varilla): en forma de bastoncillo.
- c) Formas helicoidales:
- Vibrio: ligeramente curvados y en forma de coma, judía o cacahuete.
 - Espirilo: en forma helicoidal rígida o en forma de tirabuzón.
 - Espiroqueta: en forma de tirabuzón (helicoidal flexible).
 -
- d) Algunas especies presentan incluso formas tetraédricas o cúbicas.

La amplia variedad de formas es determinada en última instancia por la composición de la pared celular.

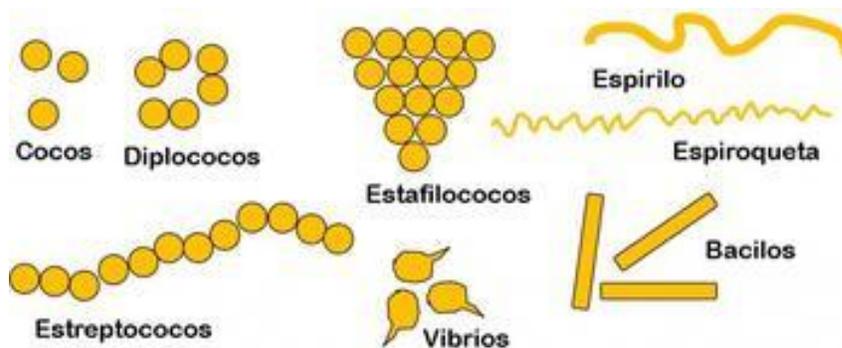


Figura 4. Formas bacterianas.

<http://mareawikinaturales.wikispaces.com/Clasificaci%C3%B3n+de+los+seres+vivos>.

En las bacterias, la reproducción es por división celular. Las bacterias crecen hasta un tamaño fijo y después se reproducen por fisión binaria que es una forma de reproducción asexual. El crecimiento bacteriano sigue tres fases (Figura 5). Cuando una población bacteriana se encuentra en un nuevo ambiente con elevada concentración de nutrientes que le permiten crecer necesita un período de adaptación a dicho ambiente. Esta primera fase se denomina fase

de adaptación o fase lag y se produce un lento crecimiento, donde las células se preparan para comenzar un rápido crecimiento, y una elevada tasa de biosíntesis de las proteínas necesarias para ello, como ribosomas, proteínas de membrana, entre otros. La segunda fase de crecimiento se denomina fase exponencial, ya que se caracteriza por el crecimiento exponencial de las células. Durante esta fase, los nutrientes son metabolizados a la máxima velocidad posible, hasta que dichos nutrientes se agoten, dando paso a la fase estacionaria, que es la última fase de crecimiento y se produce como consecuencia del agotamiento de los nutrientes en el medio. En esta fase las células reducen su actividad metabólica y comienzan a utilizar como fuente energética aquellas proteínas celulares no esenciales. La fase estacionaria es un período de transición desde el rápido crecimiento a un estado de respuesta a estrés, en el cual se activa la expresión de genes involucrados en la reparación del ADN, en el metabolismo antioxidante y en el transporte de nutrientes.

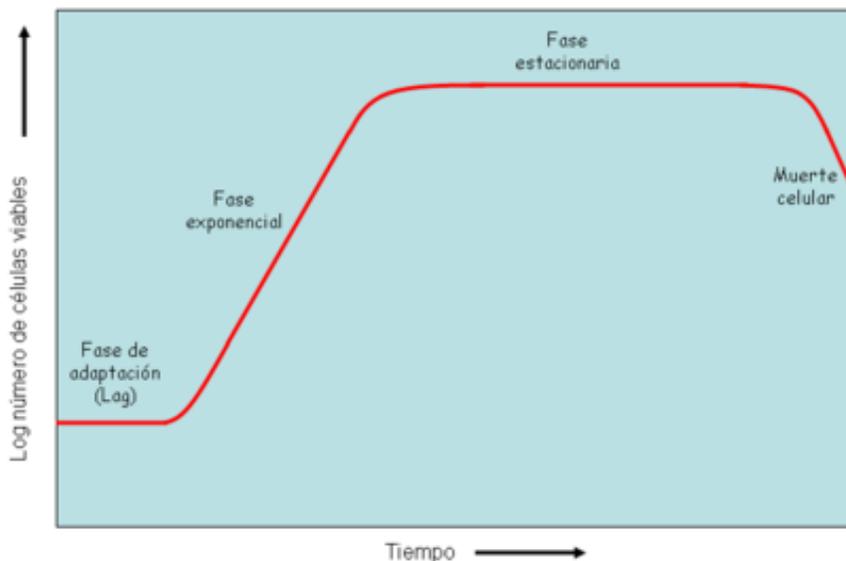


Figura 5. Curva crecimiento bacteriano. http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Curva_de_crecimiento.png

VIRUS

Los virus (del latín virus, «toxina» o «veneno») son partículas cuyo genoma es un ácido nucleico (DNA o RNA), el cual se replica en células vivas y utiliza su maquinaria metabólica para dirigir la síntesis de nuevos virus que a su vez infectarán más células.

Los virus infectan todos los tipos de organismos, desde animales y plantas, hasta bacterias y arqueas. Los virus son demasiado pequeños para poder ser observados con la ayuda de un microscopio óptico.

El primer virus conocido, el virus del mosaico del tabaco, fue descubierto por Martinus Beijerinck en 1899. Los virus se hallan en casi todos los ecosistemas de la Tierra y son el tipo de entidad biológica más abundante. El estudio de los virus recibe el nombre de virología, una rama de la microbiología.

A diferencia de los priones y viroides, los virus se componen de dos o tres partes: su material genético, que porta la información hereditaria, que puede ser ADN o de ARN; una cubierta proteica que protege a estos genes llamada cápside y en algunos también se puede encontrar una bicapa lipídica que los rodea cuando se encuentran fuera de la célula denominada envoltura vírica.

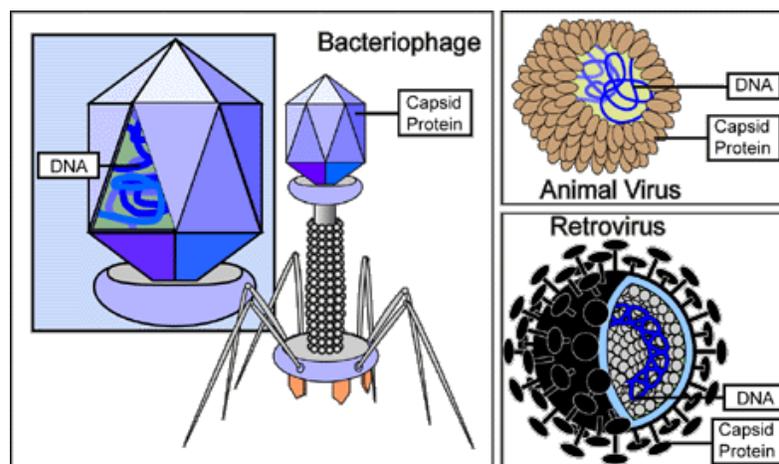


Figura 6. Tipos de virus. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Virus-types.png>

El material genético y el método por el cual los virus se replican, varían entre los diferentes tipos.

Virus ADN

La replicación del genoma de la mayoría de virus ADN se produce en el núcleo de la célula. Si la célula tiene el receptor adecuado a la superficie, estos virus entran por fusión con la membrana celular o por endocitosis. La mayoría de virus ADN son completamente dependientes de la maquinaria de síntesis de ADN y ARN de la célula hospedadora, y su maquinaria de procesamiento de ARN. El genoma vírico debe atravesar la membrana nuclear de la célula para acceder a esta maquinaria.

Virus ADN bicatenario

Este tipo de virus tiene su material genético compuesto por ADN de doble cadena y se replica usando una ADN polimerasa, que es dependiente del ADN y no del ARN. Este tipo de virus, por lo general, debe entrar en el núcleo de la célula hospedadora antes de que sea capaz de replicarse. Además, estos virus requieren de las polimerasas de la célula hospedadora para replicar el genoma viral y, por lo tanto, son altamente dependientes del ciclo celular. Para que pueda realizarse la infección y la producción de progenie del virus se requiere que la célula esté en la fase de replicación, que es cuando las polimerasas de la célula están activas.

Virus ADN monocatenario

Este tipo de virus posee en su material genético ADN de cadena sencilla y se replica usando una ADN polimerasa dependiente del ADN, al igual que el Virus ADN bicatenario. A diferencia de los virus ADN bicatenarios, éstos poseen un ADN infectante monocatenario (de cadena simple), es decir, formado por una única cadena de nucleótidos, en lugar de la habitual doble hélice. Para que exista la replicación en este virus, es necesario que el ADN de cadena simple se convierta en ADN de cadena doble en las células infectadas.

Virus ARN

Los virus ARN son únicos porque su información genética está codificada en ARN; esto quiere decir que usan el ácido ribonucleico (ARN) como material genético, o bien que en su proceso de replicación necesita el ARN. La replicación se suele producir en el citoplasma. Los virus ARN se pueden clasificar en unos cuatro grupos según su modo de replicación. La polaridad del ARN (si puede ser utilizado directamente o no para producir proteínas) determina en gran medida el mecanismo de replicación, y si el material genético es monocatenario o bicatenario. Los virus ARN utilizan sus propias enzimas para crear copias de su genoma.

Virus ARN bicatenario

Los virus de ARN bicatenario son virus que posee ARN de cadena doble en su genoma. Como la mayoría de los virus ARN, se replican en el citoplasma y no dependen de las polimerasas de las células huésped como lo hacen los virus ADN, pues incluyen estas enzimas en el virión. La traducción suele ser monocistónica, lo que significa que cada uno de los segmentos codifica una sola proteína, a diferencia de otros virus que exhiben una traducción más compleja. Una característica particular de éstos es su capacidad para llevar a cabo la transcripción de los segmentos de ARN bicatenarios bajo las condiciones apropiadas dentro de la cápside.

Virus ARN monocatenario positivo

Los virus ARN monocatenarios positivos tienen ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla de sentido positivo como material genético y no se replican usando ADN intermedio. Los virus ARN positivos son idénticos al ARNm viral y por lo tanto pueden ser inmediatamente traducidos por la célula hospedera. Aunque el ARN purificado de un virus positivo puede causar directamente una infección, es menos infeccioso que el virus completo. La replicación tiene lugar principalmente en el citoplasma y no es tan dependiente del ciclo celular como en los virus ADN. Los virus ARN de sentido positivo tienen genomas con la misma polaridad del ARNm y pueden ser empleados directamente para la síntesis de proteínas usando la maquinaria de traducción de la célula huésped. Una de estas proteínas codificadas es la ARN

replicasa, una ARN polimerasa que copia el ARN viral sin necesidad de pasar por una cadena de ADN intermedia.

Virus ARN monocatenario negativo

Este virus tiene ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla de sentido negativo como material genético y no se replica usando ADN intermedio. El ARN viral negativo es complementario del ARNm y por lo tanto debe convertirse en ARN positivo por una ARN polimerasa antes de la traducción. El ARN purificado de un virus negativo no es por sí mismo infeccioso puesto que necesita ser traducido en ARN positivo. Los virus ARN de sentido negativo utilizan una ARN polimerasa o transcriptasa para formar ARN de sentido positivo. Esto significa que el virus debe aportar la enzima ARN polimerasa puesto que ésta es dependiente del ARN. La molécula ARN de sentido positivo entonces actúa como un ARNm viral, que se traduce en proteínas por los ribosomas del hospedero. Las proteínas resultante se dedica directamente a la producción de los elementos de los nuevos viriones, tales como las proteínas de la cápside y la ARN replicasa, que se encarga de la producción de nuevas moléculas de ARN de sentido negativo.

Virus ARN monocatenario retrotranscrito

Un virus ARN monocatenario retrotranscrito (o virus ssRNA-RT) es un virus con ARN de cadena sencilla en su genoma que se replica en la célula hospedadora mediante transcripción inversa, es decir, mediante la formación de ADN a partir del molde ARN. Estos virus usan transcriptasa inversa codificada viralmente, es decir, una ADN polimerasa dependiente del ARN, para producir ADN a partir del genoma ARN viral. Este ADN a menudo se integra en el genoma del huésped, como en el caso de los retrovirus, donde es replicado y transcrito por el hospedero.

Virus ADN bicatenario retrotranscrito

Los virus de transcripción inversa se replican mediante la transcripción inversa, que es la formación de ADN a partir de una plantilla de ARN. Los virus de transcripción inversa que

contienen un genoma de ARN utilizan un intermedio de ADN para replicarse, mientras que los que contienen un genoma de ADN utilizan un intermedio de ARN durante la replicación del genoma.

Los virus varían en su forma, desde simples helicoides o icosaedros hasta estructuras más complejas. El origen evolutivo de los virus aún es incierto, algunos podrían haber evolucionado a partir de plásmidos (fragmentos de ADN que se mueven entre las células), mientras que otros podrían haberse originado desde bacterias.

Clasificación Baltimore.

David Baltimore, biólogo ganador del Premio Nobel, diseñó el sistema de clasificación que lleva su nombre. El sistema de clasificación del ICTV (Comité Internacional de Taxonomía de Virus) es utilizado en combinación con el sistema de clasificación de Baltimore en la clasificación moderna de los virus.

La clasificación de Baltimore de los virus se basa en el mecanismo de producción de ARNm. Los virus deben generar ARNm de su genoma para producir proteínas y replicarse, pero cada familia de virus utiliza mecanismos diferentes. El genoma de los virus puede ser monocatenario (ss) o bicatenario (ds), de ARN o ADN, y pueden utilizar o no la transcriptasa inversa. Además, los virus ARN monocatenarios pueden ser o positivos (+) o negativos (-). Esta clasificación reparte los virus en siete grupos:

I: Virus dsDNA (ej., adenovirus, herpesvirus, poxvirus)

II: Virus ssDNA (ej., parvovirus)

III: Virus dsARN (ej., reovirus)

IV: Virus (+)ssRNA (ej., picornavirus, togavirus)

V: Virus (-)ssRNA (ej., Ortomixovirus, rabdovirus)

VI: Virus ssRNA-RT (ej., retrovirus)

VII: Virus dsDNA-RT (ej., Hepadnaviridae)

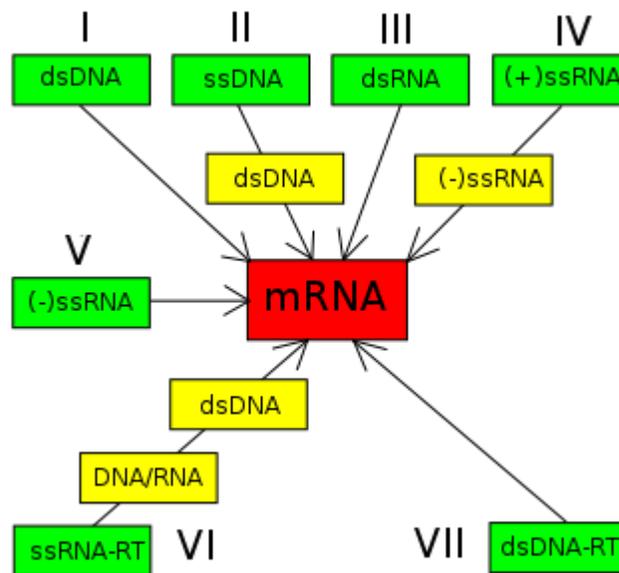


Figura 7. Esquema de la Clasificación Baltimore de los virus. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Virus_Baltimore_Classification.svg

VIROIDES

Los viroides son agentes infecciosos que poseen al igual que los virus un solo tipo de ácido nucleico y son parásitos absolutos, pero carecen de cápside y envoltura. Por lo tanto los viroides están constituidos solo por una secuencia de nucleótidos, además los viroides carecen de información para la síntesis de proteínas.

PRIONES

Las partículas infecciosas llamadas priones, están constituidas únicamente por una proteína de aproximadamente 250 aminoácidos. Es decir carecen completamente de ácidos nucleicos. Es esta la razón por la cual fue resistida durante mucho tiempo, la hipótesis de que las proteínas por si solas podían ser la causa de enfermedades infecciosas.

Las partículas proteínicas infecciosas (priones), pueden ser causante de diversas enfermedades, hereditarias o contagiosas. Este comportamiento dual tanto infeccioso como hereditario era desconocido, posteriormente se descubrió que los priones se multiplican por una vía increíble y desconocida hasta ese momento: convierten proteínas normales en moléculas infecciosas, con solo alterar la estructura proteica.

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), son las enfermedades degenerativas del sistema nervioso central que afectan a animales y seres humanos causadas por los priones. Se denominan espongiformes ya que el cerebro adquiere un aspecto parecido al de una esponja. Las EET que sufren los seres humanos son el Kuru (o muerte de la risa), la enfermedad de Creutzfeldt -Jakob (ECJ), el síndrome de Gerstman-Straussler-Scheinker (GSS) y el insomnio Familiar Fatal (IFF); las EET de animales, incluyen el scrapie (del inglés *to scrape*, raspar, por la tendencia de los animales infectados a rasparse contra postes, troncos o cercas para combatir la picazón) de ovejas y cabras, la enfermedad de agotamiento crónico de mulas y ciervos en cautiverio y la encefalitis espongiforme bovina (EEB), o enfermedad de la vaca loca.

Las EET se caracterizan por su prolongado periodo de incubación (en el hombre puede tener un periodo de incubación de 30 o más años), generalmente asociadas a declives progresivos de las funciones motoras y cognitivas (enfermedad activa), y por su evolución inevitablemente fatal. Las EET en el ser humano generalmente aparecen en personas de edad avanzada.

BIOSEGURIDAD

Bioseguridad es un conjunto de normas preventivas destinadas a proteger la salud de los funcionarios frente a riesgos por agentes biológicos, físicos o químicos en el laboratorio. La protección del personal y ambiente del laboratorio, se logra mediante la aplicación de técnicas y normativas de seguridad establecidas.

Los laboratorios dedicados al trabajo en Microbiología deben cumplir con una serie de características que aseguren las condiciones de trabajo y la seguridad de las personas.

El objetivo de la Seguridad Biológica es el de disminuir y prevenir la salida y/o exposición de agentes que puedan ser peligrosos para las personas que trabajan tanto dentro como fuera de este tipo de laboratorios y para el medio o ecosistema donde podrían ir directa o indirectamente estos agentes.

Los objetivos específicos de Bioseguridad comprenden una serie de acciones tendientes al control del riesgo que encierran las actividades en los siguientes campos:

- a) Manipulación de Microorganismos patógenos.
- b) Usos de la tecnología del ADN Recombinante.
- c) Manipulación de material infeccioso
- d) Uso de fármacos, radiaciones y elementos químicos de efecto dañino en el hombre, probado o no bien definido.
- e) Medidas de protección del ambiente.

La Seguridad Biológica se puede resumir en tres elementos indispensables que son: las técnicas de laboratorio, el equipo de seguridad y el diseño de la instalación.

Las técnicas y prácticas de laboratorio son el elemento más importante de la seguridad, ya que es de vital importancia el correcto cumplimiento de normas de trabajo dentro del laboratorio. Las personas que están en contacto con agentes infecciosos o materiales infectados deben estar

concientes de los peligros potenciales que esto significa y deben recibir la información adecuada para el manejo seguro del respectivo material.

El equipo de seguridad debe ser el adecuado para el manejo de este tipo de agentes, al igual que el diseño de su instalación.

MEDIDAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

1. Usar delantal blanco, debe usarse abrochado para prevenir la contaminación de la ropa de calle.
2. Mantener el cabello recogido o protegido con un gorro o red limpio.
3. Evitar entradas y salidas en el laboratorio con una frecuencia innecesaria.
4. Evitar idas y venidas injustificadas, movimientos bruscos y rápidos. Es necesario aprender a moverse en el laboratorio.
5. No está permitido fumar, comer o beber, ni aplicarse cosméticos dentro del laboratorio.
6. No colocar objetos personales sobre la mesa de trabajo. (No utilizar teléfonos celulares)
7. No usar los refrigeradores, ni las estufas para conservar o calentar alimentos.
8. Lavarse siempre las manos al llegar y antes de abandonar el laboratorio. Desinfectarlas cuando sea necesario. Para secarlas, usar toallas desechables o aire caliente seco.
9. No hacer uso del delantal ni pañuelos para limpiar objetos o instrumentos de trabajo.
10. Comunicar inmediatamente cualquier sospecha de riesgo químico, microbiológico o físico.
11. Las superficies donde se trabaja deben ser descontaminadas antes y después de hacer el trabajo.
12. Está prohibido pipetear con la boca.
13. Cuando se estén realizando experimentos las puertas deben permanecer cerradas.
14. En el laboratorio no se permite la presencia de animales o plantas no relacionados con el trabajo que se está realizando.

REGLAS GENERALES PARA EVITAR RIESGOS

- I. Riesgos Físicos.
 1. Asegurarse de que todos los equipos tengan línea de conexión a tierra.
 2. No mantener equipos o realizar conexiones con las manos húmedas.
 3. Mantener un elevado nivel de seguridad o irradiaciones por luz ultravioleta.

- II. Riesgos Químicos.
 1. Almacenar los materiales volátiles, inflamables y tóxicos en un gabinete metálico o en una habitación aislada del edificio. El lugar debe ser frío y bien ventilado. Estos materiales deben mantenerse en sus envases originales.
 2. No transferir grandes volúmenes de líquidos peligrosos.
 3. Transferir los materiales o inflamables en habitaciones bien ventiladas.
 4. No almacenar juntos reactivos incompatibles.
 5. Etiquetar todos los reactivos indicando con dibujo de una calavera el caso que sean productos tóxicos.
 6. Tener disponible neutralizantes para cualquier emergencia.
 7. Tener disponibles extintores de incendios.

- III. Riesgos Microbianos.
 1. Debe darse estricto cumplimiento a las normativas, con el fin de minimizar los riesgos de contaminación, enfermedades y asegurar confiabilidad de los análisis efectuados.

CLASIFICACIÓN DE RIESGO Y DE LOS LABORATORIOS DE TRABAJO BIOLÓGICO

Los agentes biológicos, químicos y físicos, se clasifican según su grado de riesgo tanto para el individuo como para la comunidad en:

- Grupo I: Agentes que en general constituyen un bajo riesgo para los individuos y la comunidad.

- Grupo II: Agentes que constituyen un riesgo moderado para los individuos y limitado para la comunidad.

- Grupo III: Agentes que constituyen un alto riesgo para los individuos y bajo para la comunidad.

- Grupo IV: Agentes que constituyen un alto riesgo para los individuos y para la comunidad.

En relación con el grado de riesgo los laboratorios que manipulan los elementos que generan este tipo de situación, se clasifican en:

1. Laboratorio básico:

Es un recinto de diseño estándar, en el cual la mayoría del trabajo se realiza en el mesón y se puede trabajar con agentes de riesgo del grupo I y II.

2. Laboratorio de contención:

Es un recinto cuyo diseño contempla un acceso restringido y barreras de contención que protegen al operador. Se puede trabajar con agentes de riesgo del grupo III.

3. Laboratorio de contención máxima

Es un recinto separado o convenientemente aislado, con sistemas de apoyo exclusivo y cuyo diseño incluye barreras de contención que dan protección máxima al personal y/o comunidad y se puede trabajar con agentes de riesgo del grupo IV.

BARRERAS DE CONTENCIÓN

Son aquellas que previenen el escape y dispersión de agentes de riesgo.

1. **Barrera primaria:** Es aquella que protege al personal y al ambiente inmediato del agente de riesgo (vestimenta de uso exclusivo, gabinete de bioseguridad y equipos provistos de dispositivos de seguridad).
2. **Barrera secundaria:** Es aquella que protege el ambiente externo contra los agentes de riesgo (diseño del laboratorio e implementación de equipos de seguridad de acuerdo al nivel de bioseguridad).
3. **Barrera microbiológica:** Es un dispositivo o sistema que evita o limita la migración de microorganismos entre los espacios situados a ambos lados del mismo y permite controlar la concentración de microorganismos en el ambiente, dentro de límites prefijados. Tiene como objetivo proteger al operador o al operador y al proceso.
4. **Barrera microbiológica parcial:** Es un dispositivo o sistema que limita la migración de microorganismos entre los ambientes situados a ambos lados del mismo. En este tipo de barrera se recomiendan Prefiltros, Filtros HEPA (High- Efficiency particulate Air), como gabinetes de bioseguridad biológica de clase I o II.
5. **Barrera de microbiología absoluta:** Es un dispositivo o sistema hermético, a prueba de filtraciones de aire o gas, que evita en forma total la migración de microorganismos entre el ambiente confinado por la barrera y el ambiente exterior de la misma. Además este tipo de barrera, puede confinar al producto o proceso, dejando al operador fuera de la misma o viceversa. Se recomienda gabinetes de Bioseguridad Biológica del tipo III.
6. **Barrera Química:** Son dispositivos o sistemas que protegen al operador del contacto con sustancias irritantes, nocivas, tóxicas, corrosivas, líquidos inflamables, sustancias productoras de fuego, agentes oxidantes y sustancias explosivas.

- 7. Barrera Física:** Son dispositivos de protección individual o colectivo que protegen contra las radiaciones ionizantes, no ionizantes, ruidos, carga calórica, quemaduras y vibraciones excesivas.

De acuerdo con el nivel de riesgo, el tipo de laboratorio, la barrera de contención requerida, los procedimientos y técnicas a usar, se han establecidos los siguientes niveles de Bioseguridad:

a) Nivel de Bioseguridad I

Es aquel que corresponde a las actividades desarrolladas en un laboratorio básico, por personal adiestrado en los procedimientos que se ejecutan en él.

- Grupo de riesgo: I
- Clasificación Laboratorio: Básico
- Ejemplo: Laboratorio de entrenamiento básico
- Microorganismos: *E. coli*, *Bacillus subtilis*
- Técnicas: corrientes
- Equipo de seguridad específico: ninguno

b) Nivel de Bioseguridad II

Es aquel que corresponde a las actividades desarrolladas en un laboratorio básico, por personal adiestrado en el manejo de agente de riesgo moderado para el personal y el ambiente.

- Grupo de riesgo: II
- Clasificación Laboratorio: Básico
- Ejemplo: Laboratorio de diagnóstico hospital clínico
- Microorganismos: Salmonella, Hepatitis, Vibrio cholerae, Brucella
- Técnicas: nivel I + acceso limitado (tener puerta y mantenerla cerrada), personal adiestrado
- Equipo de seguridad específico: gabinete de bioseguridad

c) Nivel de Bioseguridad III

Es aquel que corresponde a las actividades desarrolladas en el laboratorio de contención. El personal debe contar con adiestramiento específico para el manejo de agentes de alto riesgo.

- Grupo de riesgo: III
- Clasificación Laboratorio: de contención
- Ejemplo: Laboratorio especializado
- Microorganismos: virus encefalitis, Meningococo, SIDA
- Técnicas: nivel II + acceso restringido (la puerta se abre sólo por dentro), ventilación especial
- Equipo de seguridad específico: equipos especialmente diseñados

d) Nivel de Bioseguridad IV

Es aquel que corresponde a las actividades desarrolladas en el laboratorio de contención máxima. El personal debe estar específicamente y acuciosamente adiestrado en el manejo de agentes extremadamente de alto riesgo o ajenos a la flora habitual del país.

- Grupo de riesgo: IV
- Clasificación Laboratorio: de contención máxima
- Ejemplo: Laboratorio diagnóstico patógenos exóticos
- Microorganismos: virus Ebola.
- Técnicas: nivel III + sistemas especiales de ingreso
- Equipo de seguridad específico: equipos contención máxima, gabinete bioseguridad clase III (herméticamente cerrado)

A) Bioseguridad en el manejo de microorganismos patógenos:

El manejo de microorganismos patógenos constituye un campo de actividades múltiples, que van desde el uso con fines estrictamente experimentales de cepas patógenas, caracterización biológica de ellas, estudio de mecanismos de protección para las enfermedades que determinan, etc.

El grado de protección que es necesario proporcionar a las personas que trabajan directamente con estos organismos, el ambiente y a la comunidad se clasifica en 5 niveles.

- 1) Nivel 1: Mínimo o Elemental de Bioseguridad Biológica.
 - Ejemplo: Laboratorio de entrenamiento básico
 - Microorganismos: Familia Micrococcaceae.

- 2) Nivel 2: Permite la manipulación de microorganismos de mediana potencialidad de riesgo.
 - Ejemplo: Laboratorio de diagnóstico hospital clínico
 - Microorganismos: Familia Enterobacteriaceae.

- 3) Nivel 3: Permite el manejo de microorganismos, autóctonos o externos, los que pueden provocar enfermedades serias o letales como resultado, especialmente, de la inhalación. Es aplicable a diagnóstico clínico e investigación. Deben usarse gabinetes de seguridad biológica de clase 1 ó 2, estos deben ser descontaminados luego del trabajo.
 - Ejemplo: Laboratorio especializado
 - Microorganismos: Género *Clostridium*

- 4) Nivel 4: Se necesitan para un trabajo con agentes de alto riesgo, y externos, los que implican una seria amenaza de vida. Se utiliza gabinetes de Bioseguridad de tipo 3.
 - Ejemplo: Laboratorio diagnóstico patógenos exóticos
 - Microorganismos: *Listeria*

- 5) Nivel 5: Se denomina nivel 5 de Bioseguridad y clase V para referirse a microorganismos patógenos o genéticamente modificados que se introducen al país. Para ellos debe haber una expresa autorización de los organismos de Estado encargados de este tipo de control, y su manejo en el laboratorio debe, de acuerdo a su identificación taxonómica, seguir los niveles recomendados para cada caso. Si se desconoce su identidad u otro detalle de su patogenicidad o genética, debe aplicarse el nivel 4 mientras no se logre su total identificación y características biológicas.

B) Bioseguridad en el manejo de microorganismos patógenos de plantas:

El manejo de los microorganismos patógenos de plantas, no difiere sustancialmente del manejo de microorganismos patógenos para el hombre, Sin embargo se debe considerar que su diseminación puede causar graves problemas a la agricultura, y por lo tanto, deben controlarse además de la manipulación, el traslado de microorganismos de un lugar a otro. Junto con el traslado de plantas infectadas. A nivel de laboratorio, el material biológico (microorganismo y plantas) no deberá ser sacado sin previa autorización del jefe de laboratorio, y en ningún caso debe permitirse el traslado de plantas a casas particulares.

Ningún microorganismo considerado como patógenos de plantas debería trabajarse en un laboratorio de Nivel 1, fundamentalmente por el daño que pueda causar su diseminación en el medio ambiente.

- Ejemplo: Patógenos de plantas Nivel 2, Familia Pseudomonaceae, género *Pseudomonas*.

Patógenos de plantas Nivel 3, Familia Mucoraceae, género *Rhizopus*.

C) Bioseguridad en el manejo de los virus

Todos los virus capaces de infectar al hombre deben ser manipulados a un nivel II o mayor seguridad. Los virus de otras especies animales deben ser también manipulados a estos niveles, ya que en ocasiones pueden infectar y causar alguna patología en humanos, que en el caso de algunos virus, como Encefalitis Equina del Este o Ebola, puede causar la muerte.

Tanto para los virus de especies animales como para virus de plantas se debe considerar su potencial impacto en el medio ambiente chileno y por lo tanto, observar todas las normas para su manipulación y contención.

D) Bioseguridad en las investigaciones que hacen uso de moléculas de DNA recombinante.

El acelerado desarrollo que ha experimentado en los últimos años un conjunto de nuevas técnicas de manipulación de seres vivos y materiales biológicos, a expensas de los avances de la biología molecular, como la tecnología de DNA recombinante, ha planteado la necesidad de regulaciones y controles de investigación, de los productos producidos con estas técnicas, ante la posibilidad de impactos negativos de ellos tanto en la salud como en los ecosistemas.

Los objetivos generales de estas regulaciones van enfocados hacia la protección de la salud y del medio ambiente, al desarrollo de la investigación en el campo de la biotecnología. Para ello deben existir normativas reguladoras y estructuras organizativas, que garanticen un nivel razonable de seguridad, que permita el desarrollo de un clima de apoyo por parte de la comunidad científica y de la opinión pública en general, al continuo avance científico y tecnológico en este campo.

Se deben establecer normas mínimas que se cumplan en todas las instituciones o laboratorios en que se emplee la tecnología de DNA recombinante. Ellas deberían incluir:

- a) Procedimientos o métodos empleados en los laboratorios de microbiología.
- b) Instalaciones de laboratorios que proporcionen barreras físicas necesarias según la estimación del peligro que presentan los agentes biológicos.
- c) Aplicación de barreras biológicas específicas, a fin de reducir la probabilidad de propagación del DNA recombinante hacia el exterior.

Barreras Biológicas Específicas

Los experimentos con DNA recombinante se pueden dividir en 4 clases, en relación al control que se debe ejercer.

- 1) Experimentos que requieren ser sometidos a examen del CTNB (Comité Técnico Nacional de Bioseguridad) y su aprobación por CIB (Comité Institucional de Bioseguridad), antes de su iniciación.
- 2) Experimentos que solo requieren de aprobación Institucional de Bioseguridad antes de su iniciación.
- 3) Experimentos que requieren sólo una notificación al comité Institucional, antes de su iniciación.
- 4) Experimentos exentos.

Para llevar a cabo un plan de Bioseguridad y lograr el cumplimiento de sus objetivos, éste no podrá ponerse en práctica si no se define con claridad, la organización que tendrá a su cargo, la vigilancia para el cumplimiento de las normativas que lo regulen, estas organizaciones son los Comités de Bioseguridad. De acuerdo con la experiencia y recomendaciones que ya están en práctica en otros países, un plan de Bioseguridad debe contar con:

a) Un Comité Técnico Nacional de Bioseguridad (CTNB):

- Tendrá como responsabilidad, desarrollar el Manual de Normativas al que estarán sujetos los Laboratorios, Industrias o Instituciones que manipulen o usen material o técnicas de riesgo.
- Establecer un sistema de inspectoría, evaluación y certificación de instalaciones.
- Desarrollar una Actividad de asesoría Técnica a los organismos de Gobierno.
- Recomendar las medidas necesarias cuando sea oportuno.
- Mantener permanente contacto y asesoría con los Comités Institucionales de Bioseguridad.

b) Un Comité Institucional de Bioseguridad (CIB)

- Este Comité se considera el nivel primario de responsabilidad frente a su personal y a la comunidad.
- Entre sus funciones están, velar por el cumplimiento de las normativas señaladas en el Manual del CTNB, y en sus propias normas.
- Mantener un programa permanente de inspección y procedimientos.
- Velar por la capacitación técnica de su personal.
- Llevar un archivo de las actividades de la institución.

c) un Manual Técnico de Normativas de Bioseguridad.

- Constituye un importante elemento de trabajo y la base para el desarrollo de las actividades del CTNB y CIB. Su contenido debe estructurarse de acuerdo a las grandes áreas de interés de Bioseguridad, además debe contener un glosario de términos que facilite la comprensión y homogeneidad del lenguaje técnico.

ESTERILIZACION

Esterilización se define como la destrucción completa o eliminación total de los microorganismos patógenos y saprófitos que se encuentran en el interior o en la superficie de objetos y sustancias. El criterio práctico de la esterilidad es la ausencia de crecimiento microbiano en un medio adecuado.

La eliminación de los microorganismos puede efectuarse mediante procesos físicos, mecánicos o químicos. Los métodos físicos y mecánicos se incluyen en el término esterilización y los métodos químicos en el concepto de desinfección.

El método escogido para esterilizar un producto depende fundamentalmente de su naturaleza y estabilidad frente al calor u otros agentes esterilizantes. Así por ejemplo, cuando se necesite agregar suero equino a un medio de cultivo líquido, para enriquecerlo, no se puede aplicar calor para esterilizarlo, ya que se produciría la coagulación de las proteínas del suero alterando su composición. Situación semejante ocurre con otras sustancias o materiales termolábiles, para los cuales se utilizan métodos de esterilización que no alteren su estabilidad, uniformidad o identidad de dichas sustancias o materiales.

CLASIFICACION DE LOS METODOS DE ESTERILIZACION

1. **METODOS FISICOS:** se basan en la aplicación de agentes físicos naturales.

Los métodos físicos conducen a lo que se designa con el nombre de asepsia, es decir ausencia total de microorganismos patógenos y saprófitos.

- CALOR SECO

- A la llama

- Por aire caliente

- CALOR HUMEDO

Por agua en ebullición
Por vapor fluente
Por vapor de agua a presión

- RADIACIONES

Luz solar
Radiación ultravioleta
Radiaciones ionizantes

2. **MÉTODOS QUÍMICOS:** se consigue detener el metabolismo bacteriano a través de sustancias químicas como por ejemplo óxido de etileno, fenol, alcohol, halógenos, tensioactivos, etc.

Los métodos químicos conducen a la antisepsia (impedimento o retraso del desarrollo de microorganismos patógenos en relación con organismos vivos) y/o a la desinfección (destrucción de microorganismos patógenos y saprófitos sobre objetos o superficies inanimadas). Entre los métodos químicos se encuentran: alcoholes, cloro, yodo, yodoforos, fenol, iones de metales pesado, agentes alquilantes, detergentes, formaldehído.

Generalidades sobre desinfectantes químicos.

- a) La acción viricida de los desinfectantes ácidos o alcalinos depende de su pH, es decir de su concentración de iones hidrógeno.
- b) Los desinfectantes ácidos y alcalinos no deben mezclarse pues se neutralizan y pierden su capacidad viricida.
- c) Las superficies tratadas con un tipo de desinfectante no deben ser sometidas a la acción de otros, a menos que se aplique previamente un lavado con agua.

d) Nunca se deberá lavar un producto con una soda y desinfectar luego con un ácido o viceversa.

La clohexidina es una sustancia antiséptica de acción bactericida y fungicida. A concentraciones de 0,2% y 0,12% tiene una baja actividad como fungicida, ya que se requieren concentraciones más altas para poder tener una eficiente actividad contra estos microorganismos. Por una prolongada exposición o uso excesivo del antiséptico, ocasiona pigmentación de tejidos duros y tejidos blandos. Además la clorhexidina se utiliza como antiséptico de preferencia en cirugías. En solución acuosa al 4% se utiliza en el lavado de manos quirúrgico, y al 5% para antisepsia de la piel previo a procedimientos quirúrgicos.

El hexaclorofeno es un desinfectante derivado halogenado del fenol, que posee actividad bacteriostática y detergente. Este derivado fenólico penetra fácilmente a través de las membranas celulares de las bacterias y al combinarse con las proteínas citoplasmáticas las desnatura y precipita. Tiene actividad contra numerosas bacterias gram positivas. La absorción de hexaclorofeno por la piel sana es elevada, por lo que la falta de enjuague podría ocasionar la aparición de niveles tóxicos de la droga en sangre.

Los yodoforos son compuestos yodados unidos a un agente solubilizante o transportador que posee características viricidas. La dilución recomendada dependerá, de la cantidad de yodo activo.

Los detergentes enzimáticos son limpiadores a base de enzimas y detergentes no iónicos con pH neutro, no poseen acción corrosiva sobre ópticas, instrumental de cirugía endoscopia (metales y plásticos), son capaces de saponificar las grasas, sufractar, dispersar y suspender la suciedad, disolver y degradar cualquier materia orgánica, incluso en lugares de difícil acceso; debido a que contienen distintas enzimas tales como: amilasas, proteasas, lipasas y celulasas, degradando de igual manera la sangre, plasma y material proteico, con lo que minimizan factores de riesgo e infección.

Respecto a los sanitizantes, son compuestos que reducen el número de microorganismos a un nivel seguro, pero no necesariamente elimina los microorganismos del medio ambiente y objetos. La principal diferencia entre un desinfectante y un sanitizante es la dilución a la cual se utilice, el desinfectante debe tener una mayor capacidad para matar bacterias patógenas en comparación con la de un sanitizante.

3. **MÉTODOS MECÁNICOS:** las sustancias que no se pueden esterilizar por métodos físicos ni químicos, se pueden esterilizar por un método mecánico como es la filtración.

Filtración: es aplicable a la esterilización de líquidos y gases. Cuando la sustancia a filtrar no puede resistir, sin descomponerse, la acción del calor. Se basa en procesos físico-químicos observados entre los cuerpos microbianos o elementos en suspensión y una sustancia semiporosa. Así se consigue separar y retener los microorganismos de los líquidos que los contienen.

Los líquidos a filtrar deben atravesar por presión o vacío, pequeños canalículos a nivel de cuyas paredes los microorganismos son retenidos por adsorción. En el mecanismo de adsorción influyen los siguientes factores: viscosidad del líquido, pH, cargas eléctricas, tiempo y temperatura.

Los filtros (de asbesto, vidrio, porcelana, celulosa) tienen un diámetro de poro inferior al diámetro de las bacterias. Un tamaño de poro de 0.22 μm es capaz de retener bacterias y sus esporas (no retienen virus).

MANEJO DEL AUTOCLAVE

- a) Debe haber suficiente agua destilada en el fondo del autoclave
- b) Colocar el material convenientemente tapado (algodón hidrófobo, gasa, papel craft) en un cesto metálico
- c) Cerrar herméticamente la tapa
- d) Encender el sistema calórico y abrir la llave de escape para eliminar el aire (que es desplazado por el propio vapor), ya que si éste permanece en el interior alterará la relación temperatura – presión
- e) Asegurarse que salga todo el aire residual (hasta que comience a salir vapor de agua)
- f) Inmediatamente cerrar la llave de escape de vapor
- g) Comienza a acumularse el vapor (indicado en el manómetro) y a aumentar la temperatura
- h) Cuando se llegue a la temperatura y presión deseada (121°C), se debe regular el gas para mantener estos valores constantes. Si es un autoclave eléctrico se regula automáticamente mediante un termorregulador
- i) Transcurrido el tiempo necesario (15 a 20 minutos) se corta la fuente calórica
- j) La llave de escape de vapor se abre ligeramente para evacuar lentamente el vapor del autoclave
- k) Cuando la presión marque cero, se puede abrir el autoclave y retirar el material para evitar un sobrecalentamiento

Precauciones en el uso del Autoclave:

- a) El autoclave se debe cargar distribuyendo en material en forma homogénea, evitando la formación de bolsas de vacío
- b) Evitar sobrecargar el autoclave, ya que impide la circulación homogénea del vapor
- c) La causa más frecuente de fallas de esterilización es la evacuación incompleta del aire, lo que no permite que la temperatura alcance el nivel deseado aún cuando la presión si lo haga. De ahí la importancia que el equipo tenga ambos marcadores
- d) Si se utiliza material con tapas roscas, éstas no deben estar completamente cerradas para permitir la entrada del vapor.



Figura 8. A: Autoclave de laboratorio. B: Autoclave de uso médico.
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Autoclave%281%29.JPG>.
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Melag_Autoclave_01.JPG

CONTROL DE ESTERILIZACIÓN

El proceso de esterilización se puede garantizar mediante la monitorización de controles físicos, químicos o biológicos, hay algunos controles que se realizan de forma periódica y otros que se realizan cada vez que se esteriliza un material (Figura 9).

Controles físicos

Son registros numéricos y/o gráficos integrados en el esterilizador. Estos registros son de parámetros físicos del ciclo de esterilización como temperatura, presión, humedad relativa, tiempo, etc. Antes de cada proceso de esterilización estos parámetros se ajustan a las especificaciones requeridas y, dado los controles físicos, se comprueba que han sido correctos durante todo el ciclo.

Indicadores químicos

Se utilizan para monitorizar la presencia de variables exigidas para que el proceso de esterilización sea satisfactorio. Entre los indicadores químicos se encuentran los indicadores

impresos en los envases individuales (bolsas y rollos) o en las cintas adhesivas que se colocan en los envoltorios de los paquetes con el material que se va a esterilizar, el viraje de color permite demostrar que dicho material ha sido expuesto a un proceso de esterilización.

Indicadores biológicos

Se define como “sistema de prueba microbiológica que opone una resistencia definida a un proceso de esterilización especificado”. Mediante los controles biológicos se determina la viabilidad de un microorganismo después de ser sometido a un proceso de esterilización. Se utilizan portadores inoculados con microorganismos vivos y resistentes al método de esterilización. Los portadores se preparan en paquetes pruebas que se procesan en un ciclo de esterilización con carga completa. Una vez finalizada la esterilización el portador se cultiva. Los sistemas biológicos deben aplicarse en cada ciclo de esterilización y en combinación con controles físicos y químicos para demostrar con seguridad la eficacia del proceso de esterilización.

Las presentaciones de los indicadores biológicos son: portadores inoculados, tiras de esporas, esporas en ampollas y autocontenidos. Por ejemplo, en los procesos de esterilización por vapor a ciertas temperaturas, se emplean esporas de cepas de *Geobacillus stearothermophilus* (Donk) Nazina et al. (ATCC® 7953™), debido a la resistencia que presentan a esta forma de esterilización, en los procesos de esterilización por calor seco se emplean comúnmente esporas de una subespecie de *Bacillus subtilis* (*Bacillus atrophaeus* Nakamura (ATCC® 9372™). Las esporas de cepas de *Bacillus pumilus* Meyer and Gottheil (ATCC® 27142™) han sido utilizadas como indicadores biológicos para verificación periódica de procesos de esterilización por radiaciones ionizantes.

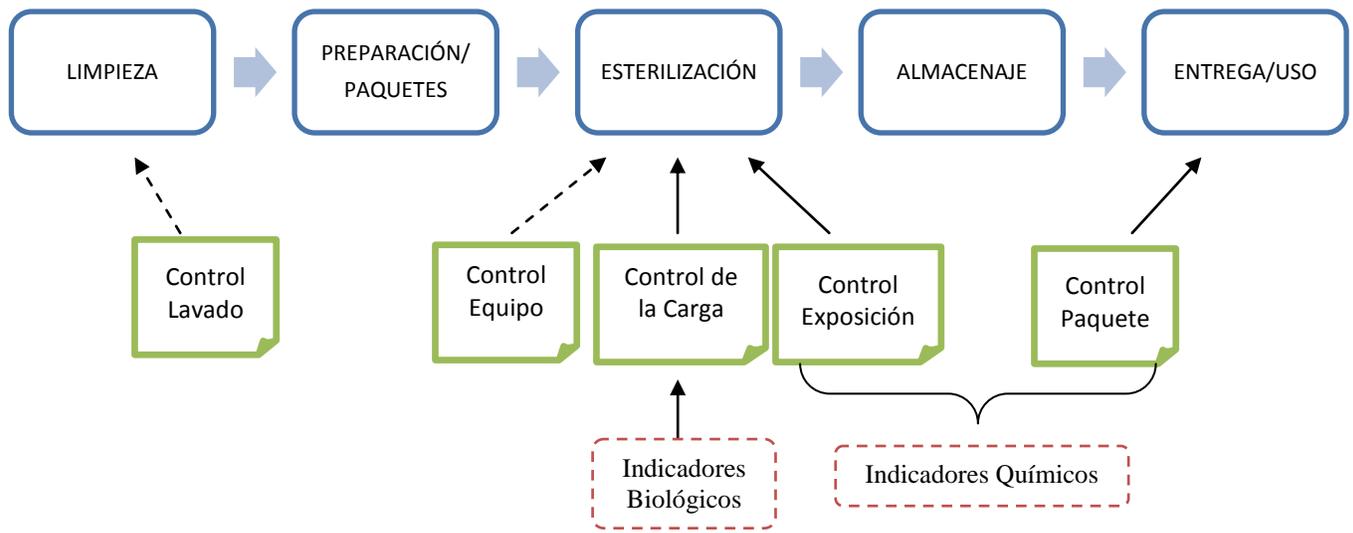


Figura 9. Sistema de registro de calidad del proceso de esterilización

MATERIAL CORTO PUNZANTE

Corresponde a materiales con capacidad de corte o perforación de la piel que debe ser manipulado con máximo cuidado y descartado en recipientes rígidos, impermeables y resistentes a punciones. El recipiente de descarte debe estar disponible próximo al área de uso, en soportes apropiados, preferentemente en la unidad del paciente. Es importante considerar que el recipiente de descarte no se debe sobrepasar la capacidad de llenado.

Con estas medidas de precauciones para cada procedimiento que involucre manejo de material cortopunzante y fluidos de riesgo se previene la exposición laboral a sangre y fluidos corporales de riesgo, lo cual es fundamental para prevenir infecciones por VIH, hepatitis B y C. Además se debe considerar que la exposición laboral a sangre y/o fluidos corporales de riesgo se puede producir a través de la exposición percutánea, a mucosas o a piel no intacta; el tipo más frecuente y de mayor riesgo de transmisión es el percutáneo, es decir a través de un accidente cortopunzante, en el cual esté involucrado sangre y/o fluido corporal de riesgo.

Las situaciones de riesgo se definen como aquellas conductas que ocasionan mayor incidencia de accidentes, en el caso de un accidente cortopunzante son por ejemplo: recapsular agujas posterior a su uso, cambio de agujas al tomar hemocultivos, procedimientos con pacientes inquietos, falta de cooperación del paciente por información insuficiente, uso de elementos de protección de tamaño inadecuado como guantes, no seguir paso a paso los procedimientos descritos.

LIMPIEZA

Las superficies tienen riesgo mínimo de transmisión directa de infección, sin embargo pueden contribuir a la contaminación cruzada, por medio de las manos de los profesionales de la salud y de los instrumentos o productos que podrían ser contaminados o entrar en contacto con esas superficies y posteriormente contaminar a los pacientes u otras superficies. De esta manera, es fundamental la higiene de las manos de los profesionales de la salud y la limpieza y desinfección de superficies para prevenir y reducir las infecciones relacionadas a la asistencia en salud.

Entre los factores que favorecen la contaminación del ambiente están: las manos de los profesionales de salud que están en contacto con las superficies, la falta de utilización de técnicas básicas de bioseguridad, mantenimiento de superficies húmedas, mojadas o con polvo, malas condiciones de los revestimientos, mantenimiento de materia orgánica de origen humano que puede servir como sustrato para la proliferación de microorganismos o favorecer la presencia de vectores. Por lo tanto, se resalta la importancia de la elaboración de protocolos rigurosos de limpieza y desinfección de superficies en los servicios de salud, para el control de los factores de posible contaminación.

LAVADO DE MANOS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2009 publicó la guía sobre la higiene de manos en los centros sanitarios que explica el modelo de los cinco momentos, que corresponden a los momentos en que los profesionales de los centros sanitarios de todo el mundo deben realizar la higiene de manos. Estos cinco momentos son:

1. Antes del contacto con el paciente.
2. Antes de realizar una tarea limpia/aséptica.
3. Después del riesgo de exposición a líquidos corporales.
4. Después del contacto con el paciente.
5. Después del contacto con el entorno del paciente.

Tipos de lavado de manos:

- I. Lavado de manos rutinario
- II. Lavado antiséptico
- III. Lavado quirúrgico

I. Lavado de manos rutinario: Su objetivo es eliminar la flora transitoria de las manos y la suciedad y materia orgánica si la hubiera.

1. Técnica con agua y jabón:
 - De elección cuando las manos están visiblemente sucias.
 - Se utiliza agua, jabón líquido (mejor con dosificador o dispensador), lavabo y toalla de papel desechable.
 - Humedecer las manos con agua, preferiblemente templada.
 - Aplicar una dosis de jabón preferiblemente con dosificador.
 - Frotar palma contra palma, palma sobre dorso, espacios interdigitales y muñecas durante al menos 10 segundos
 - Aclarar con abundante agua.

- Secarse con toalla desechable y cerrar el grifo con la misma toalla evitando tocarlo.

2. Técnica con solución alcohólica:

- De elección cuando las manos están visiblemente limpias. Se necesita solución alcohólica.
- Con las manos secas aplicar una dosis de solución alcohólica adecuada al tamaño de las manos, aproximadamente entre 3 y 5 mL.
- Frotar suavemente durante 20 ó 30 segundos hasta que se evapore la solución palma contra palma, palma con dorso, zona interdigital, rotación de las manos, pulgar con el puño cerrado, rotar la punta de los dedos de una mano sobre la palma de la otra.

II. Lavado de manos antiséptico: Su objetivo es eliminar la suciedad, materia orgánica y flora bacteriana transitoria superficial y parte de la flora bacteriana residente de las manos, consiguiendo además una cierta actividad antimicrobiana residual.

1. Técnica con agua y jabón:

- Se necesita agua, jabón antiséptico, lavabo y toalla de papel.
- Es igual que la del lavado de manos rutinario, lo que cambia es el tipo de jabón que se usa.
- Humedecer las manos con agua, preferiblemente templada.
- Aplicar una dosis de solución jabonosa del clorhexidina al 4% o povidona yodada al 7,5%.
- Frotar palma contra palma, palma sobre dorso, espacios interdigitales y muñecas durante al menos 10 segundos.
- Aclarar con abundante agua.
- Secarse con toalla desechable y cerrar el grifo con la misma toalla evitando tocarlo.

2. Técnica con solución alcohólica:

- Se necesita agua, jabón, lavabo, toalla de papel y solución alcohólica.
- Es una combinación del lavado rutinario y aplicación posterior de solución alcohólica.
- Humedecer las manos con agua, preferiblemente templada.

- Aplicar una dosis de jabón preferiblemente con dosificador.
- Frotar palma contra palma, palma sobre dorso, espacios interdigitales y muñecas durante al menos 10 segundos y aclarar con abundante agua.
- Secarse con toalla desechable y cerrar el grifo con la misma toalla evitando tocarlo.
- Frotar suavemente con solución alcohólica durante 30 segundos hasta que se evapore la solución palma con palma, palma con dorso, zona interdigital, rotación de las manos, pulgar con el puño cerrado, rotar la punta de los dedos de una mano sobre la palma de la otra.

III. Lavado de manos quirúrgico: Su objetivo es eliminar la flora bacteriana transitoria y al máximo la flora bacteriana residente de las manos previo a un procedimiento invasivo que por su especificidad o su duración requiere un alto grado de asepsia y efecto residual antimicrobiano prolongado.

1. Técnica con agua y jabón:

- Para practicarla se necesita lavabo con grifos de pedal o codo, agua, jabón antiséptico (clorhexidina al 4% o povidona yodada al 7,5%), cepillo de uñas desechable (preferiblemente impregnado con solución antiséptica), toalla o compresa estéril.
- Abrir el grifo y humedecer las manos y antebrazos con agua.
- Aplicar jabón antiséptico.
- Lavado mecánico de manos y antebrazos limpiando con el cepillo solo debajo de las uñas. No frotar con el cepillo el resto de la piel para evitar lesiones.
- Aclarar con abundante agua corriente.
- Aplicar de nuevo jabón antiséptico en manos y antebrazos friccionando al menos durante 2 minutos.
- Aclarar con abundante agua.
- Secar por aplicación, sin frotar, con una compresa o toalla desechable estéril, comenzando por los dedos y bajando hasta los codos.
- Durante todo el proceso mantener las manos por encima de los codos.

2. Técnica con solución alcohólica:

- Se necesita lavabo con grifos de pedal o codo, agua, jabón líquido, cepillo de uñas, toalla de papel desechable y solución alcohólica.
- Lavado de manos usando un jabón dermoprotector durante al menos un minuto y aclararlas bien.
- Realizar un secado de las manos con una toalla de papel.
- Verter el desinfectante en las manos ayudándose del dispensador, apretando con el codo.
- Aplicar la solución alcohólica en cantidad suficiente para mantener húmedas de 3 a 5 minutos, friccionando las manos, antebrazos y codos, poniendo especial atención en espacios interdigitales, pulgares y uñas.
- Aplicar una dosis final para antebrazos, terminando por las manos.
- No secarse las manos, dejar que se evapore el producto y no colocarse los guantes hasta su total secado.

MEDIOS DE CULTIVO

Los microorganismos en general pueden vivir y multiplicarse sobre substratos nutritivos preparados en el laboratorio, denominados medios de cultivo. Los Medios de Cultivo son preparados estériles que contienen sustancias necesarias para el desarrollo de los microorganismos.

Todos los microorganismos requieren agua, carbono, nitrógeno, hidrógeno, calcio, fósforo y hierro como elementos vitales. Los microorganismos exigentes requieren además factores de crecimiento como aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias que no son capaces de sintetizar.

CONDICIONES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

1. Contener sustancias nutritivas necesarias para el desarrollo de los microorganismos (tales como aminoácidos, carbohidratos, polialcoholes, vitaminas, minerales).
2. Tener un pH que permita un desarrollo óptimo, por lo general las bacterias patógenas necesitan un pH neutro o ligeramente alcalino (7.0 – 7.4), en cambio las levaduras y hongos requieren un pH ácido (5.0).
3. Estar previamente esterilizados o preparados en condiciones asépticas.
4. Estar protegidos de la contaminación ambiental por tapones de algodón cardé, tapones de goma, tapas metálicas o roscas.

UTILIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

1. Aislamiento de bacterias desde una muestra o material patógeno (secreción purulenta, orina, órgano, fecas, etc.) o de un alimento (leche, carne, etc.)
2. Estudio morfológico de las colonias.
3. Conservación de cepas identificadas (colección de cepas microbianas o cepario).
4. Clasificación y tipificación de bacterias por estudio de sus propiedades bioquímicas en medios diferenciales.
5. Obtención de toxinas o investigación de sus características.
6. Cultivo y cosecha de bacterias para la elaboración de productos biológicos (vacunas, antígenos, bacterinas, toxoides, etc.).

CLASIFICACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO:

SEGÚN SU ESTADO FISICO

1. Medios Líquidos: se utilizan preferentemente para favorecer el desarrollo bacteriano de células estresadas. En determinadas ocasiones no se pueden sustituir por los medios sólidos, por ejemplo en la síntesis de exotoxinas, pigmentos, enzimas, etc.
 - Ejemplo: Agua peptonada, Caldo común, Caldo Cerebro Corazón, Caldo Saboureaud, etc.
2. Medios Sólidos: se utilizan para obtener bacterias aisladas por la formación de colonias sobre la superficie del medio de cultivo y para el estudio de la morfología de las colonias, lo que no permiten los medios líquidos. Se diferencian porque tienen una sustancia de sostén, que puede ser agar-agar.
 - Ejemplo: Agar Común, Agar SS, Agar Cerebro Corazón, Agar Saboureaud, etc.

3. Medios Semisólidos: se utilizan para estudiar la motilidad de las bacterias. Tienen un menor porcentaje de agar, por lo que no solidifican totalmente a la temperatura ambiente.
- Ejemplo: Agar MIO, Agar SIM.

Los medios sólidos tienen generalmente agar-agar como agente solidificante, espesante o gelificante. El agar-agar es una sustancia hidrofílica de carácter coloidal procedente de diversas especies de algas marinas, especialmente del género *Gelidium*, que tiene la propiedad de formar un gel. Químicamente el agar-agar es un polisacárido de cadena larga, dependiendo de su tamaño el poder gelificante.

El agar-agar se expende en forma granulada o en polvo, es insoluble en agua fría, se disuelve solamente a temperatura de ebullición, se mantiene en forma viscosa a 60–80 °C y solidifica en forma de un gel estable a 40–45 °C. Resiste perfectamente la esterilización a 121 °C y por su capacidad de retener agua no se deshidrata fácilmente, lo que permite almacenar los medios por un largo período de tiempo a 5 °C.

La gelatina no puede reemplazar al agar en la preparación de medios sólidos, ya que descompuesta por muchos tipos de bacterias. Se añade a los medios de cultivo para estudiar si las bacterias son capaces de degradarla (presencia de enzimas gelatinasas).

SEGÚN SU UTILIDAD PRACTICA

1. Medios corrientes, comunes o básicos
2. Medios especiales
 - Medios mejorados
 - Medios selectivos o de diagnóstico
 - Medios diferenciales o indicadores

1. **MEDIOS CORRIENTES:** son aquellos medios apropiados para el cultivo y mantención de la mayoría de las bacterias. Sirven de base para la preparación de los medios especiales.
 - Ejemplo: Caldo común, Agua peptonada, Agar nutritivo, etc.

2. **MEDIOS ESPECIALES:** son aquellos medios de cultivo que por su riqueza nutritiva, sirven para el cultivo de bacterias muy exigentes. Contienen en su formulación sustancias inhibitoras para ciertas bacterias, que permiten el aislamiento y diagnóstico precoz de aquellas bacterias que nos interesan por ser los agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas. También pertenecen a este grupo aquellos medios que por adicción de sustancias químicas determinadas, facilitan el diagnóstico por características bioquímicas de algunas especies microbianas.

Los medios especiales se clasifican en:

- 2.1. **Medios Mejorados:** se obtienen añadiendo a los medios corrientes sustancias de mayor valor nutritivo, que tienen el efecto de proporcionar condiciones favorables para el cultivo de bacterias exigentes (Ej. Estreptococos, Corynebacterium).

Las sustancias añadidas pueden ser: sangre desfibrinada (conejo, cordero o caballo), suero sanguíneo (equino), suero fetal bovino, huevo, cerebro, corazón, trozos o extracto de hígado, carne o levadura, etc.

La mayoría de estas sustancias por ser proteicas coagulan con el calor, lo cual impide que sean esterilizadas en autoclave. Deben por lo tanto ser esterilizadas por filtración o ser agregadas a los medios previamente esterilizados, en condiciones de rigurosa asepsia. Ejemplo: Agar Sangre, Agar Cerebro Corazón, etc.

- 2.2 **Medios Selectivos:** generalmente el microorganismo patógeno causante del cuadro infeccioso que se desea aislar a partir de la muestra, no se encuentra puro sino que convive con otras especies sin interés diagnóstico. Así por ejemplo es frecuente que las

fecas, orina, exudados, alimentos, agua, etc. estén altamente contaminadas con bacterias saprófitas que por su desarrollo exuberante en los medios de cultivo corrientes, inhiben el crecimiento o enmascaran la presencia del agente patógeno buscado.

Los medios selectivos se caracterizan por estimular el desarrollo de ciertas especies bacterianas y a la vez inhibir el desarrollo de otras especies, lo que permite el aislamiento y diagnóstico de las bacterias con facilidad y rapidez. Estas características se obtienen por la adición de sustancias tales como colorantes de anilinas, sales biliares, antibióticos, etc. Ejemplo: Agar Brucella, Caldo Selenito Cistina, etc.

2.3 Medios Indicadores o Diferenciales: son medios comunes o mejorados, con adición de ciertas sustancias que ponen de manifiesto determinadas propiedades bioquímicas, inherentes a algunas especies bacterianas, como por ejemplo: producción de gas, H₂S, de ácidos, de sustancias alcalinas, acción proteolítica, acción lipolítica, etc.

Estas sustancias o indicadores permiten diferenciar rápidamente una especie microbiana de otra semejante; por este motivo se denominan medios indicadores o diferenciales. Ejemplo: Agar Baird Parker, Agar Rambach, etc.

- a) El agar Mac Conckey se utiliza para el aislamiento e identificación de *Escherichiacoli*. Es un medio mejorado ya que tiene Cristal Violeta y Sales Biliares que inhiben el desarrollo bacterias Gram positivas.
- b) El Caldo Tripticasa Soya es un medio corriente, ya que permite el desarrollo de una amplia variedad de bacterias. Puede hacerse más selectivo para el desarrollo de *Staphylococcus aureus*, si se le agrega un 10% de NaCl, lo que no permite el crecimiento de otras bacterias saprófitas.

SEGÚN SU ORIGEN

1. Origen animal (Caldo Cerebro Corazón)
2. Origen vegetal (Caldo papa, Caldo Levadura)
3. Sintéticos (Medios deshidratados)

Los medios de cultivo comerciales deshidratados son productos a los cuales se le ha eliminado el agua y todas las interferencias de tipo químico, con un pH ajustado, que se han controlado física, química y bacteriológicamente. Es decir es un producto estandarizado.

COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Según la finalidad, los medios de cultivo pueden tener en su composición los siguientes ingredientes:

- 1) Aminoácidos, hidrolizado de proteínas (peptonas)
- 2) Extractos
- 3) Productos biliados
- 4) Carbohidratos
- 5) Productos bioquímicos
- 6) Colorantes e indicadores

1) Productos Bioquímicos

A los medios de cultivo se les agrega generalmente una diversa variedad de sustancias bioquímicas, que pueden tener el efecto de estimular el desarrollo bacteriano o ser agentes selectivos, como es el caso de los antibióticos.

2) Colorantes e indicadores

Estas sustancias se utilizan en los medios selectivos y diferenciales. Los colorantes actúan como agentes bacteriostáticos o como inhibidores del crecimiento. Se utilizan principalmente:

Fucsina básica, Verde brillante, Verde de Malaquita, Cristal Violeta, Eosina, Azul de Metileno, Tionina, etc.

Los indicadores son sustancias químicas que varían de color según el pH del medio. Se utilizan en los medios diferenciales y permiten visualizar, por cambios de color del medio de cultivo o de las colonias, la ocurrencia de distintas reacciones bioquímicas.

Indicador	Acido	Neutro	Alcalino
Rojo Fenol	Amarillo (6.8)	Rojo	Fucsia (8.4)
Rojo Neutro	Amarillo (6.8)	Rojo	Amarillo (8.0)
Rojo de Metilo	Rojo fuerte (4.4)	Rojo	Amarillo (6.0)
Azul Bromotimol	Amarillo (6.0)	Verde	Azul (7.7)
Púrpura BC	Amarillo (5.2)	Azul	Púrpura (6.8)
Fenolftaleína	Incoloro (8.3)	Rosado	Fucsia (10)

OBTENCION DE CULTIVOS PUROS: SIEMBRA Y AISLAMIENTO

SIEMBRA O CULTIVO: es la operación que consiste en depositar asépticamente microorganismos en un medio de cultivo

Principios Generales

1. Practicar la siembra en medios de cultivos previamente esterilizados y adecuados para la bacteria que se desea aislar
2. Emplear instrumentos estériles
3. No contaminar ni destruir los microorganismos
4. Depositar los microorganismos asépticamente en los medios de cultivo
5. Esterilizar los instrumentos empleados, inmediatamente después de cada operación

Los instrumentos empleados corrientemente en la siembra son:

1. Asa de Siembra: se utiliza alambre de platino, o alambre de una aleación níquel-cromo (nicrom) que tiene propiedades semejantes a la primera, con la ventaja de ser de menor costo. Este alambre tiene un diámetro de 0,3 a 1 mm y está sujeto a un mango o porta asa metálico o de vidrio. El alambre puede ser totalmente recto (asa en punta o aguja), recto con un anillo de aproximadamente 3 mm de diámetro en la extremidad (asa) o aplastado en el extremo (espátula). Puesto a la llama del mechero alcanza rápidamente el rojo blanco (1.300°C) y también rápidamente se enfría.
2. Pipeta Pasteur: es un tubo de vidrio con una extremidad afilada u cerrada. La otra extremidad que se encuentra abierta está protegida por una mota de algodón cardé o hidrófobo.

La técnica general de siembra dependerá de:

- a) Estado físico del material a sembrar (sólido o líquido)
- b) Estado físico del medio de cultivo (agar o caldo)
- c) Ambiente en el cual crece el microorganismo (aerobiosis, microaerofilia o anaerobiosis)

SIEMBRA EN ANAEROBIOSIS

Los medios de cultivo para las bacterias anaerobias poseen en general las mismas sustancias nutritivas que para las bacterias aerobias, pero es necesario privarlos del O₂ libre o en disolución mediante distintos métodos:

1.- Métodos Físicos:

- a) Expulsión del aire por ebullición: antes de efectuar la siembra, los medios líquidos y sólidos se llevan a ebullición en baño María con el fin de eliminar el aire. Este proceso se denomina “regeneración” de los medios. Esto evita el reoxigenamiento de los medios líquidos.
- b) Reemplazo del aire por gases inertes: este método consiste en la eliminación del aire, mediante bomba de vacío, del recipiente que contiene los medios sembrados y su reemplazo por Hidrógeno, Nitrógeno, CO₂, etc.

2. Métodos Químicos:

- a) Sustancias reductoras tóxicas para las bacterias, por cuyo motivo no se adicionan a los medios de cultivo, sino que en un lugar adecuado del recipiente que contiene los tubos sembrados. Se utiliza principalmente Acido Pirogálico o Hidróxido de potasio

- b) Sustancias reductoras no tóxicas que se agregan directamente a los medios de cultivo , por ejemplo Glucosa al 1-2%, Tioglicolato de sodio 0.1 – 0.2%, Cistina al 0.05% entre otros.

3. Métodos Biológicos:

- a) Tejidos animales que se adicionan a los medios de cultivo, como por ejemplo: carne picada, cerebro, hígado, etc.

AISLAMIENTO Y TRANSPLANTE (TRASPASO)

Cuando se realiza una siembra en medios sólidos es deseable obtener las bacterias en forma asiladas. Sin embargo, generalmente las muestras tienen una flora mixta, que se manifiesta por el desarrollo de distintas especies bacterianas: algunas son saprófitas (flora normal) o contaminantes del proceso de muestreo y otras son las que tienen un rol patógeno.

Para realizar diagnósticos microbiológicos el organismo debe ser primero aislado y mantenido puro en condiciones de laboratorio.

Si en la placa de agar ha crecido más de un tipo de bacterias, se debe realizar el aislamiento de 1 colonia a otro medio de cultivo semejante o a medios selectivos.

Si fuese necesario las colonias se someterán a uno o más re-aislamientos, hasta obtener cultivos puros; es decir, presenten la misma morfología y microscópicamente correspondan a un solo tipo de bacteria.

Sólo en este momento se puede proceder a la identificación de la especie bacteriana mediante el traspaso de 1 sola colonia a una batería de medios diferenciales.

El aislamiento de los microorganismos se puede conseguir por los siguientes procedimientos:

1. Métodos Mecánicos

1.1. Aislamiento por diseminación o agotamiento: consiste en efectuar estrías sobre la superficie del agar, utilizando un asa de cultivo, sin pasar 2 veces por el mismo lugar.

Técnicas de aislamiento por estriación:

Uno de los métodos utilizados es el siguiente (Figura 10):

- El inóculo se extiende sobre una pequeña superficie del agar
- Se flamea el asa y se trazan 3 líneas oblicuas a partir del depósito original (sin pasar el asa 2 veces por el mismo sitio)
- Flamear el asa, girar la placa levemente en sentido de las manecillas del reloj y volver a trazar 3 líneas de la misma forma anterior
- Flamear el asa, girar la placa levemente en sentido de las manecillas del reloj y volver a trazar 3 líneas de la misma forma anterior
- Flamear el asa, girar la placa levemente en sentido de las manecillas del reloj y volver a trazar 3 líneas de la misma forma anterior
- Flamear el asa y trazar una estriación en forma de zig-zag sobre la superficie del agar que ha quedado libre.

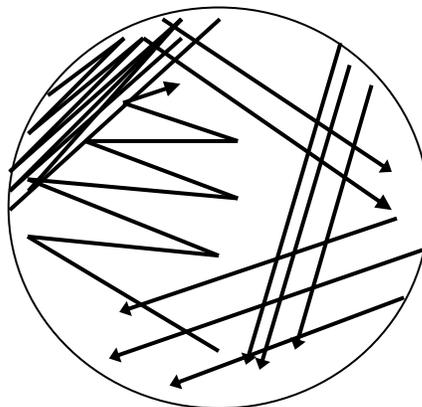


Figura 10. Esquema de siembra por agotamiento.

EXAMEN MICROSCÓPICO DE BACTERIAS

I. EXAMEN MICROSCÓPICO

El examen microscópico de las bacterias se puede realizar de 2 maneras:

1.1 En fresco

1.2 En preparaciones fijadas y teñidas

1.1. En fresco:

Este examen se emplea para el estudio de algunas características de los microorganismos, como por ejemplo movilidad, aglutinación, yemación, entre otras, es decir se realiza una observación de los microorganismos vivos. Cuando se observa al microscopio un líquido orgánico, como sangre, líquido céfalo-raquídeo, orina, pus, etc., se puede también estudiar elementos citológicos como leucocitos y la presencia o no de bacterias en ellos, glóbulos de pus, parásitos, etc.

Técnica:

- a) Si la muestra es líquida, colocar una gota del material patológico en un portaobjetos
- b) Si la muestra es sólida, hacer una suspensión en suero fisiológico y colocar una gota sobre un portaobjetos
- c) Si se desea hacer una observación en fresco a partir de una colonia aislada, colocar una gota de suero fisiológico en un portaobjetos y luego con el asa de cultivo tomar una porción de la colonia y hacer una suspensión
- d) En todos los casos, cubrir la preparación con un cubreobjetos
- e) Cuando se sospecha que existen pocas bacterias en la muestra, se debe dejar sedimentar o centrifugar
- f) Cuando la muestra es muy espesa (pus, expectoración), suspender en suero fisiológico y agitar

g) Una vez lista la preparación, observar en microscopio con el condensador abajo, utilizando el objetivo seco de mayor aumento

1.2. En preparaciones fijadas y teñidas

Las bacterias vivas son casi incoloras y no tienen suficiente contraste con el medio que las rodea, lo cual hace su observación difícil. Al teñirlas se les otorga un contraste de color respecto al medio que las rodea, ya que el colorante reacciona con la célula pero no con el medio externo, con lo cual se hacen más visibles.

Las ventajas principales de la tinción son:

- Proporciona un contraste que permite una mejor observación de las bacterias
- Permite el estudio en detalle de la morfología de las bacterias
- Permite el estudio de las estructuras internas y externas de las bacterias (flagelos, esporas, núcleo, cápsula, pared celular, etc)
- Permite lograr un aumento mayor (lente de inmersión)

Antes de teñir las bacterias, se realiza primero una extensión del material a examinar y posteriormente la fijación del material al portaobjetos.

A) Extensión

- a) Los portaobjetos deben estar absolutamente limpios y desgrasados, para lo cual es conveniente mantenerlos sumergidos en una mezcla de alcohol - acetona
- b) Secar prolijamente un portaobjetos
- c) Colocar en el centro una gota del material a examinar, si este es líquido
- d) Si se trata de una colonia cultivada en un medio sólido, colocar en el centro del portaobjetos una gota de suero fisiológico y luego con el asa de cultivo tomar una porción de la colonia y hacer una suspensión
- e) Extender la muestra con el asa, en una capa delgada y uniforme, sin llegar hasta los bordes del portaobjetos.

B) Fijación

- a) La fijación tiene por objetivo matar los microorganismos, coagular el protoplasma de la célula y adherir firmemente las bacterias al portaobjetos, evitando así que se desprenda durante los lavados posteriores
- b) El calor es un buen agente fijador ya que preserva las estructuras de la bacteria, en su forma y posición, sin producir mayores alteraciones
- c) Pasar rápidamente la preparación sobre una llama suave, 2 ó 3 veces
- d) Dejar que la preparación se enfríe y volver a pasar por la llama
- e) Repetir hasta que la preparación quede completamente seca
- f) Posterior a cada paso por el mechero, tocar la parte inferior del portaobjetos con el dorso de la mano contraria, para calcular la intensidad del calor aplicado
- g) No debe calentarse jamás hasta quemar la piel
- h) También se puede fijar la muestra dejándola secar al aire o mediante fijadores químicos como alcohol etílico o alcohol – acetona

C) Coloración

Los colorantes empleados en bacteriología son colorantes sintéticos. En la práctica los colorantes se dividen en 2 grupos: ácidos y básicos.

Los colorantes Básicos están formados por un catión coloreado y un anión incoloro, mientras que en los colorantes Ácidos es todo lo contrario. Las células bacterianas son ricas en ácidos nucleicos que tienen cargas negativas en forma de fosfatos. Estas cargas se combinan con los colorantes básicos cargados positivamente, por lo cual la bacteria se tiñe uniformemente, ya que existen ácidos nucleicos tanto en el núcleo (ADN), como en el citoplasma (ARN). Los colorantes ácidos tienen mayor afinidad a combinarse con el citoplasma de las células de organismos superiores.

En bacteriología se usan casi exclusivamente los colorantes básicos (Cristal Violeta, Fucsina, Safranina, Azul de Metileno, etc).

Existen 2 métodos de coloración principales:

- 1) Coloración Simple
- 2) Coloración Doble

1) Coloración Simple: consiste en hacer actuar sobre la preparación fijada un solo colorante (Azul de Metileno, Safranina, Fucsina diluída al 10%, etc).

Técnica

- a) Cubrir la preparación con el colorante
- b) Dejar actuar por 1 - 2 minutos
- c) Lavar con agua corriente
- d) Secar con papel absorbente y luego a la llama suave (sin quemar)
- e) Observar con el condensador arriba y con objetivo de inmersión

2) Coloración Doble: consiste en hacer actuar 2 colorantes diferentes, con una decoloración intermedia, sobre una preparación fijada. La coloración doble consta en general de 4 pasos:

- Coloración primaria
- Adición de un mordiente, que es una sustancia que aumenta la afinidad o atracción célula – colorante. La bacteria se tiñe más intensamente bajo la acción del mordiente, siendo mucho más difícil lavar el colorante posteriormente. Ejemplos de mordientes son algunos ácidos, bases, sales metálicas y solución yodo-yodurado
- Decoloración
- Tinción con colorante de contraste

2.1. Tinción de Gram: es la coloración más empleada en bacteriología por su gran utilidad en la clasificación de las bacterias. Descubierta por Christian Gram (1884), mientras desarrollaba una tinción para bacterias en tejidos, descubrió un método de tinción diferencial para las bacterias. Esta tinción es de gran utilidad ya que permite una clasificación taxonómica de las bacterias, en Gram positivas y negativas, que se relaciona además con otras propiedades morfológicas (Figura 11).

Técnica

- a) Teñir la preparación ya fijada con Cristal Violeta durante 2 minutos
- b) Eliminar el exceso de colorante y cubrir con Lugol durante 1 minuto (mordiente)
- c) Decolorar rápidamente con Alcohol Acetona
- d) Lavar con agua corriente (en este momento las bacterias Gram positivas están teñidas de color violeta y las Gram negativas están decoloradas)
- e) Teñir con Fucsina fenicada durante 30 segundos
- f) Lavar con agua corriente
- g) Secar con papel absorbente y luego a la llama suave (sin quemar)
- h) Observar con el condensador arriba y con objetivo de inmersión
- i) Las bacterias Gram positivas se tiñen de color Violeta y las Gram negativas de color Rojo.

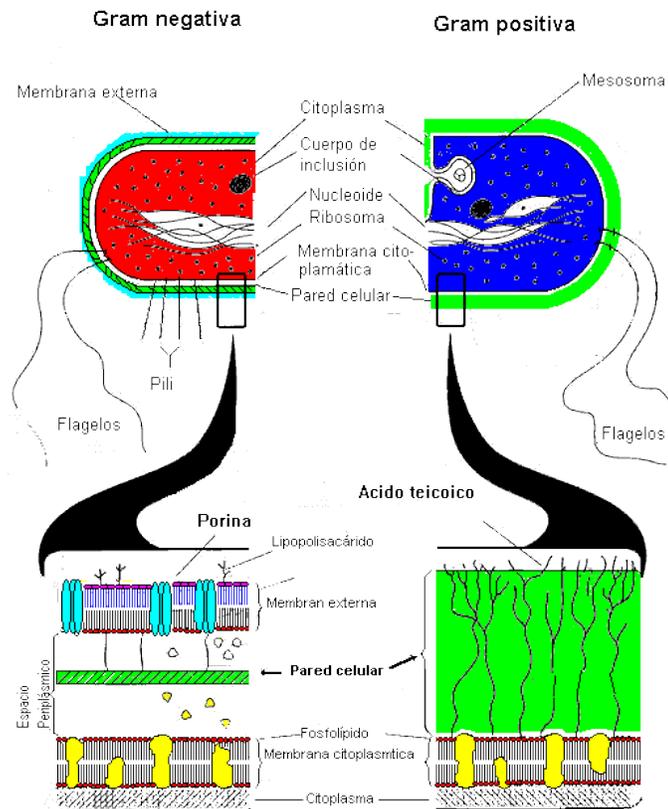


Figura 11. Diferencias entre bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. http://educativa.catedu.es/44700165/aula/archivos/repositorio/3250/3408/html/22_pared_bacteriana.html

2.2 Tinción de ZielhNeelsen: se emplea para diferenciar bacterias ácido-alcohol resistentes (principalmente el *Mycobacterium* de la tuberculosis), de los que no lo son. Las bacterias Acido Alcohol resistentes tienen en la pared celular una gran cantidad de Acido Micólico el cual está unido covalentemente a un fosfolípido (Arabino galactano), el cual forma un complejo estable con la Fucsina, de carácter altamente hidrofóbico que impide la penetración del decolorante.

Técnica

- a) Teñir la preparación ya fijada con Fucsina concentrada de Zielh Neelsen durante 3 a 5 minutos, calentando la preparación suavemente con la llama del mechero, hasta la emisión de vapores (La preparación de no se debe secar y el colorante no debe hervir)

- b) Decolorar rápidamente con Acido-Alcohol hasta que se desprenda el colorante (en este momento las bacterias ácido-alcohol resistentes están teñidas de color rojo y las no resistentes están decoloradas)
- c) Lavar con agua corriente
- d) Teñir con Azul de Metileno durante 2 minutos
- e) Lavar con agua corriente
- f) Secar con papel absorbente y luego a la llama suave (sin quemar)
- g) Observar con el condensador arriba y con objetivo de inmersión
- h) Las bacterias ácido-alcohol resistentes se tiñen de color Rojo y las no resistentes de color Azul

TINCIONES DE ESTRUCTURAS BACTERIANAS

1. Tinción de Flagelos:

Los flagelos son una estructura demasiado fina para ser observadas por los métodos corrientes de tinción. En general todos los métodos se basan en el empleo del Acido Tánico, cuyas sales forman un precipitado grueso sobre la pared celular y los flagelos. De esta forma el diámetro de los flagelos aumenta artificialmente y es posible observarlas después de teñirlos con Fucsina Básica. Debe emplearse cultivos jóvenes de no más de 15 a 20 horas y la extensión debe hacerse suavemente para no romper los flagelos.

Ejemplos de tinción para diferentes estructuras bacterianas:

- FLAGELOS: Tinción de Casares – Gil, los flagelos se observan de color rojo al igual que las bacterias.
- CAPSULA: Tinción de Olt, la cápsula se observa de color anaranjado y las bacterias de color rojo (específica para *Bacillus anthracis*).
- ESPORAS: Tinción de Schaffer y Fulton, las esporas se tiñen de color verde y la parte vegetativa de color rojo.

MORFOLOGIA BACTERIANA

Una vez teñidas las preparaciones, se observan al microscopio utilizando un objetivo de inmersión (100 X). De esta forma las bacterias se pueden clasificar según su tinción (Gram positivas o negativas, Alcohol-Acido resistentes o no, etc) y además permite el estudio de su morfología.

Se distinguen las siguientes formas y agrupaciones bacterianas:

a) Cocaceas:

Son bacterias de forma esférica, que pueden presentarse aisladas o reunidas de diferentes maneras de acuerdo a su multiplicación que se efectúa por división directa:

- Según su agrupación se distinguen:

- Diplococos: permanecen unidos de a 2 posterior a su división
- Estreptococos: cocaceas unidas en cadena
- Estafilococos: cocaceas que forman grupos irregulares en forma de racimos
- Tetracocos: cocaceas dispuestas de a 4
- Sarcinas: cocaceas formando grupos en forma de cubos

- Según su tinción pueden ser Gram positivos o negativos

b) Bacilos:

Son bacterias alargadas, en las cuales predomina en diámetro longitudinal sobre el transversal.

- Según su forma pueden ser:

- largos y delgados
- cortos y gruesos
- con bordes paralelos y extremos cortados en ángulo recto

- con bordes convexos y extremos de bordes que se juntan en los extremos
 - con un extremo más grueso que el opuesto (forma de clava o maza)
- Según su agrupación se distinguen:
- Diplobacilos: unidos de a 2
 - Estreptobacilos: unidos en cadena
- Según su tinción pueden ser Gram positivos o negativos, Zeilh Neelsen positivos o negativos

c) Cocobacilos:

Son formas intermedias entre ambos grupos. Pueden ser Gram positivos o negativos

d) Espirilos:

Son bacterias delgadas que presentan incurvaciones en varios planos (tienen forma helicoidal). También existen espirilos con una sola incurvación, llamados Vibrios.

También es posible examinar con detención algunas estructuras presentes en las bacterias, como por ejemplo:

e) Esporas:

Es una formación endocelular presente en algunas especies de bacilos

- Según su forma pueden ser

- esféricas
- ovaladas

- Según su tamaño

- Bacteridia (el diámetro de la spora es menor que el del cuerpo de la bacteria)
- Clostridio (cuando el diámetro de la spora es mayor que el diámetro transversal de la bacteria, alterando su la forma)

- Según su posición

- central
- subterminal
- terminal

f) Flagelos:

Son apéndices cilíndricos, flexibles y frágiles, de longitud variable. La poseen determinadas especies bacterianas y su presencia sólo se evidencia mediante tinciones especiales

- Según su número y disposición pueden ser

- Monótricas (1 solo flagelo polar)
- Lofótricas (poseen un haz de flagelos en un polo)
- Anfítricas (tienen flagelos en ambos polos)
- Perítricas (bacterias rodeadas de flagelos)

g) Pili o Fimbrias:

Son apéndices más finos cortos y más numerosos que los flagelos. Se encuentran en algunas especies y sólo pueden observarse por microscopía electrónica.

h) Cápsula:

Es una estructura que rodea la pared celular y la presentan sólo algunas especies bacterianas. Se puede observar al microscopio de luz corriente mediante tinciones especiales.

ANTIBIOTICOS Y ANTIBIOGRAMA

Los antibióticos son agentes quimioterapéuticos que se utilizan para el tratamiento de las enfermedades infecciosas producidas por bacterias. Al igual que los desinfectantes y antisépticos interfieren con el desarrollo de los microorganismos, pero se diferencian porque actúan dentro del hospedero sin producir efectos nocivos sobre éste.

La efectividad de los antimicrobianos se define por su espectro de actividad. Por ejemplo la Penicilina actúa sólo sobre las bacterias Gram (+). Los llamados fármacos de amplio espectro actúan tanto sobre Gram (+) como Gram (-).

En la práctica se llaman antibióticos a todos los antimicrobianos, pero desde el punto o de vista farmacológico se distinguen 4 tipos de fármacos distintos:

1. Antibióticos
2. Antibióticos semi sintéticos
3. Antimicrobianos
4. Antifúngicos

ANTIBIOTICOS

Los antibióticos son todas aquellas sustancias químicas producidas por organismos vivos (bacterias, hongos o vegetales) que tiene el poder de inhibir el desarrollo o destruir bacterias y otros microorganismos en soluciones débiles.

ANTIBIOTICOS SEMISINTETICOS

Algunos antibióticos han sido sintetizados artificialmente una vez conocida su fórmula estructural, denominándose sintéticos o semisintéticos. El primer antibiótico obtenido de esta forma fue el Cloramfenicol en 1949.

Actualmente muchos antibióticos que originariamente se aislaron a partir de fuentes naturales, hoy en día son preparados en forma artificial. De esta manera se ha mejorado su actividad (espectro), ampliado sus vías de administración y permite su producción a gran escala.

Las Penicilinas semisintéticas derivan todas de la Penicilina G (benzil penicilina). Las más importantes son:

- Meticilina : dimetoxifenil penicilina
- Oxacilina: 5-metil 3-fenil 4-isoxazolil penicilina
- Cloxacilina: 5-metil 3-clorofenil 4-isoxazolil penicilina
- Ampicilina: alfa aminobenzil penicilina

Las penicilinas semisintéticas tienen actividad frente a *Staphylococcus aureus* y otras bacterias Gram (+) resistentes a la Penicilina G. La Ampicilina tiene además acción sobre bacterias Gram (-).

ANTIMICROBIANOS

Los antimicrobianos son aquellos productos completamente sintéticos, tales como las Sulfonamidas, Amoxicilina, Cefalosporinas de 2da y 3ra generación (Cefalotina, Cefradina, Cefazolina, Cefoxitina, etc).

MECANISMOS DE ACCION DE LOS ANTIBIOTICOS

El agente antimicrobiano ideal debería tener una toxicidad selectiva, es decir, a determinadas concentraciones tolerables por el huésped deberían actuar sobre procesos metabólicos o de síntesis que sólo existen en las bacterias. En la actualidad el concepto de toxicidad selectiva sólo la comparten la Penicilina y las Cefalosporinas, que actúan solamente contra las bacterias.

A nivel celular, la mayoría de los antimicrobianos actúan en alguna de estas formas:

1. Inhibición de la síntesis de la pared celular: produce la inhibición de la síntesis de novo del péptido glicano, la pared celular bacteriana se debilita y la célula se lisa
 - Penicilina, Cefalosporinas, Bacitracina, Vancomicina y Cicloserina,
2. Alteración de la permeabilidad de la membrana celular: se produce cambios en la permeabilidad celular produciéndose la pérdida de metabolitos
 - Anfotericina B, Polimixinas, Nistatina, Colistina (Polimixina E), etc
3. Inhibición de síntesis de proteínas: interfieren con la síntesis de aminoácidos, proteínas y enzimas a nivel ribosomal, por lo tanto se inhibe la actividad enzimática bacteriana. Las bacterias tienen ribosomas de 70S en tanto que las células mamíferas tienen ribosomas 80S, razón por la cual no alteran de forma importante la síntesis de proteínas del huésped.
 - Cloramfenicol, Eritromicina, Lincomicina, Tetraciclinas, Aminoglicósidos, Amikacina, Neomicina, Estreptomicina, Gentamicina, Kanamicina, etc
4. Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos: se inhibe la síntesis de ADN o ARN, ya sea por inhibición de las polimerasas o por unión al ADN molde
 - AcidoNalidíxico, Novobiocina, Sulfonamidas, Trimetropim, Rifampicina.

De acuerdo a su actividad sobre las poblaciones bacterianas o fúngicas los antimicrobianos pueden ser:

- a) Bactericidas o Fungicidas: son capaces de producir la muerte de los microorganismos en forma rápida
- b) Bacteriostáticos o Fungistáticos: solamente impiden el crecimiento de los microorganismos

Los microorganismos frente a los antibióticos pueden comportarse de las siguientes maneras:

1. Ser susceptibles, es decir presentar receptores específicos para el antibiótico, pudiendo éste ejercer su acción sobre ellos.
2. Ser resistentes, ya sea en forma natural o adquirida, pudiendo la bacteria crecer y multiplicarse en presencia del antibiótico

ANTIBIOGRAMA

La tendencia cada vez mayor de muchas bacterias a hacerse resistentes a los antibióticos, parece indicar que el uso inadecuado de los antimicrobianos puede conducir a graves consecuencias, de ahí la importancia de elegir el antibiótico adecuado para una determinada bacteria, con la ayuda de pruebas de susceptibilidad *in vitro* o antibiograma. Sin embargo la elección del antibiótico más apropiado también dependerá de las concentraciones efectivas que pueda alcanzar el antibiótico *in vivo*, que depende de la biodisponibilidad de la droga.

Para comprender la importancia del antibiograma, se requiere saber lo que es el espectro antimicrobiano y la resistencia de las bacterias frente a un antibiótico

- Espectro antimicrobiano: Es la capacidad que tiene un antibiótico de actuar sobre un determinado número o clase de especies bacterianas
- Resistencia: Es la capacidad que poseen ciertas bacterias de crecer y multiplicarse en presencia de un antibiótico

De estas 2 definiciones se deduce que antes de hacer un tratamiento con un antibiótico, es necesario hacer un estudio "*in vitro*" de la sensibilidad o susceptibilidad del microorganismo causantes de la enfermedad frente a diversos antibióticos que podrían utilizarse.

Existen varios métodos para realizar antibiogramas, los que pueden clasificarse en 2 grupos:

1. Método de dilución en serie del antibiótico
2. Método de difusión del antibiótico en agar

1. METODO DE DIFUSION EN AGAR (METODO DEL DISCO)

Este es el método más empleado por ser rápido, sencillo y muy reproducible. Se utiliza desde la década de los 40 y fue estandarizado en 1966 por Kirby Bauer. Actualmente se utiliza una modificación de la técnica de Kirby Bauer la cual ha sido estandarizada por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)

Esta prueba mide la capacidad de un antibiótico (discos de papel impregnados con cantidades conocidas de antibióticos en UI o ug) de difundir a través de un agar, para inhibir el crecimiento de las bacterias. La magnitud de la zona de inhibición no es una función de la actividad in vivo del medicamento. Las magnitudes de los halos no son comparables entre diferentes antibióticos.

La prueba del disco es un test cualitativo, es decir, mide solamente la inhibición del crecimiento y por lo tanto no indica necesariamente actividad bactericida. Sin embargo existe una correlación directa entre los diámetros de inhibición y los CMI obtenidas por la prueba de dilución en tubo.

1. Medios de cultivos recomendados

- a) Se recomienda el uso de agar Muller Hinton, pH 7.2 – 7.4
- b) En caso de realizar la prueba con bacterias de difícil desarrollo, se utiliza Agar sangre o agar Muller Hinton adicionado de 5% de sangre desfibrinada de cordero
- c) Las placas preparadas (con una altura del agar de 4 mm y completamente nivelado) se dejan a temperatura ambiente, el tiempo suficiente para que se evapore la humedad de la superficie. También se pueden colocar en la estufa a 37°C por 30 minutos.

2. Preparación del inóculo

- a) Empleando un asa de cultivo recoger 4 a 5 colonias desde un cultivo completamente puro y aislado de la cepa a investigar
- b) Transferir las colonias a 5 mL de Caldo Muller Hinton, Caldo Nutritivo o Caldo Tripticasa Soya y realizar una emulsión
- c) Comparar la turbidez de la emulsión con el estándar de turbidez (Mc Farland 0,5, que equivale a una concentración de 10^8 bacterias/mL)
- d) Si la emulsión queda más turbio que es estándar, se debe diluir con el mismo caldo utilizado
- e) Si la emulsión tiene menor turbidez, se debe agregar mayor cantidad de colonias

3. Inoculación de las placas

- a) Introducir una tórula de algodón estéril en el caldo ajustado
- b) Elevar la tórula sobre la superficie del caldo y presionarla contra las paredes interiores del tubo para eliminar el exceso de inóculo
- c) Frotar la superficie del agar con la tórula en forma densa, en 3 direcciones (horizontal, vertical y diagonal) y cubriendo toda la superficie de la placa
- d) Dejar secar la placa por 5 – 10 minutos
- e) Elegir los antibióticos a utilizar de acuerdo a la identificación de la cepa
- f) Colocar los discos de sensibilidad con pinza esterilizada a la llama y previamente enfriada
- g) Presionar suavemente los discos para asegurar su implantación a la superficie del agar
- h) Colocar los discos suficientemente separados. No más de 6 a 8 por placa
- i) Una vez colocado un disco, nunca se debe mover, ya que el antibiótico comienza a difundir casi instantáneamente
- j) Incubar la placa a 37°C por 18 – 24 horas

Los discos a utilizar para el antibiograma tienen diferentes presentaciones: Sensidiscos, Multidiscos y Dispensador simultáneo de discos.

4. Medición de los halos

- a) Las zonas de inhibición (diámetro) se miden con una regla y se expresa en milímetros (incluyendo los 0.7 cm de diámetro del disco)
- b) La lectura se realiza contra un fondo oscuro con luz reflejada
- c) Las zonas se miden por la parte posterior de la placa sin abrirla
- d) Si se emplea agar sangre debe abrirse la placa y medir desde arriba
- e) El punto límite para medir el halo es la inhibición completa de desarrollo observado a ojo desnudo, excepto para Sulfonamidas y si se trata de especies *Proteus*
- f) Con las Sulfonamidas, puede observarse un desarrollo tenue (80% de inhibición) dentro del halo, debido a que las bacterias alcanzan a multiplicarse algunas generaciones antes que el antibiótico actúe sobre ellas
- g) Las cepas de *Proteus* presentan un pequeño velo de desarrollo dentro de la zona de inhibición que no debe ser considerado
- h) El diámetro de los halos se compara con una tabla estandarizada que fija los límites entre sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia.

2. METODO DE DILUCION EN SERIE

Es un método cuantitativo que se realiza en medios líquidos. El antibiótico en estudio se distribuye en concentraciones progresivamente decrecientes en una serie de tubos con un medio apropiado, sembrándose después en este medio cantidades idénticas del cultivo de 18 horas de incubación de la bacteria cuya sensibilidad se quiera estudiar.

Se incuban los tubos a 37°C por 24 horas y se busca el último tubo en que hay ausencia de desarrollo. La concentración del antibiótico de este tubo nos indica el título de sensibilidad o Concentración Mínima Inhibitoria del antibiótico (CMI), siendo expresada en ug/mL. La CMI es la concentración más baja del agente antimicrobiano a la cual el microorganismo no es

capaz de desarrollarse, pero que al ser inoculado en un caldo libre del agente se desarrolla normalmente. Esta determinación permite establecer con exactitud una relación con los niveles alcanzados por la droga en la sangre y así elegir el antibiótico adecuado. Por ejemplo si una bacteria presenta una CMI de 100 ug/mL y el antibiótico no es capaz de alcanzar estos niveles sanguíneos, no tendrá efecto sobre la bacteria.

También se puede calcular la Concentración Mínima Bactericida (CMB) que es la concentración más baja del agente antimicrobiano a la cual el microorganismo no es capaz de desarrollarse y que al ser inoculado en un caldo libre del agente tampoco se desarrolla.

Este es un método caro, lento y engorroso, pero con un mayor rango de seguridad que el método del disco.

MICOLOGIA

Los hongos por sus características morfológicas, fisiológicas y ecológicas forman un reino llamado FUNGI, caracterizado por poseer una estructura celular eucariota, carecen de clorofila, unicelulares (levaduras) o pluricelulares (hongos filamentosos), típicamente inmóviles, de nutrición heterótrofa y de reproducción sexuada y/o asexual.

Existen 2 grandes grupos de hongos:

1. Hongos levaduriformes
2. Hongos filamentosos o miceliados o mohos

1. Hongos Levaduriformes:

Son hongos unicelulares globosos, ovoides o alargados de 2 – 6 μm . que presentan reproducción asexual a través de yemación (*Torulopsis*, *Candida*), fisión binaria (*Schizosaccharomyces*) o procesos intermedios (*Saccharomyces*). Algunas presentan reproducción sexual por ascosporas o teliosporas. Algunas levaduras forman pseudomicelios, que son brotes que continúan unidos a la célula madre formando cadenas con constricciones completas sin unidad citoplasmática. Las levaduras se desarrollan a temperaturas óptimas entre 25 y 30°C y forman colonias lisas, de textura húmeda, cremosas o membranosas (sin hifas aéreas) semejantes a las bacterias.

A la observación en fresco, aparecen de mayor tamaño que las bacterias y se observan células en yemación o fisión. Presentan una tinción Gram (+).

Las levaduras presentan metabolismo fermentativo, por lo cual su identificación se realiza por el estudio de la fermentación de los azúcares.

2. Hongos Filamentosos o Mohos:

Son hongos formados por una serie de ramas tubulares llamadas hifas, el conjunto de las cuales forman el micelio. Se reproducen por la formación de esporas, las cuales pueden ser pigmentadas y le dan el color al hongo. Al centro de la colonia se ubican las hifas fértiles que dan origen a las esporas, razón por la cual los hongos son más coloreados en esa zona. Se caracterizan por presentar crecimiento rápido, tener reservorios naturales en el suelo, plantas, animales y vegetales muertos, crecen a temperaturas de 25 – 30°C y sus esporas o conidios son transportados por el aire, son normalmente inhalados y presentan gran resistencia en el medio ambiente.

La mayoría de los hongos filamentosos de interés clínico y vegetal, tienen una fase de reproducción sexual (telomorfa), pero es su forma asexual (anamórfica) la que casi siempre produce las enfermedades y es observada en las muestras.

CLASIFICACION TAXONOMICA

El reino Fungi se clasifica en 4 Phylum (según última actualización taxonómica, 1994). Phylum Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota.

REINO FUNGI:

Phylum Zygomycota

Están caracterizados por un micelio aseptado y septos en la base de las estructuras reproductoras o septos secundarios, forman micelio vegetativo de tipo algodonoso. Presentan reproducción sexual por formación de zigosporas y reproducción asexual por esporangiosporas.

Ejemplo: *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia* (esporangiosporas) y *Syncephalastrum* (merosporas).

Phylum Ascomycota (Ascos = sacos)

Estos hongos se caracterizan por presentar filamentos tabicados, forman esporas sexuales endógenas (ascosporas) contenidas en pequeños sacos llamados ascos y esporas asexuadas exógenas (conidios). Ejemplo: Aspergillus, Penicillium, algunas levaduras como Candida e Histoplasma y dermatofitos como Microsporum y Trichophyton.

Phylum Deuteromycetes (Hongos Mitospóricos)

Los Deuteromycetes u Hongos imperfectos comprende hongos filamentosos tabicados y levaduriformes que si bien pueden presentar reproducción sexual (solo algunas especies), la forma asexual es la más importante ya que ésta produce las enfermedades.

Ejemplo: hongos patógenos (Aspergillus y Penicillium), dermatofitos (Trichophyton y Microsporum) y levaduras patógenas (algunas Cándidas)

Phylum Basidiomycota

Los Basidiomycetes son hongos que presentan filamentos tabicados y formación de esporas sexuales (basidiosporas) que se desarrollan en el extremo de células en forma de escudo (basidios) Ejemplo: Cryptococcus y Trichosporum.

MORFOLOGIA GENERAL DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS

- HIFAS: los hongos filamentosos están constituidos por una serie de ramas tubulares, habitualmente aisladas y conservando su individualidad pero que permanecen unidas por un tronco central, que se denominan hifas.
- COLONIA, TALO O MICELIO: es el conjunto de desarrollo de un hongo (conjunto de hifas), pudiendo ser visible macroscópicamente como una masa cremosa, algodonosa, vellosa, etc.

El micelio puede ser de 2 tipos:

- a) Micelio Vegetativo: es aquél destinado a dar sostén, protección y nutrición al hongo.
 - b) Micelio Reproductivo: es el conjunto de hifas fértiles que nacen del micelio vegetativo pero que se diferencian biológica y morfológicamente para las funciones de reproducción.
- ESPORAS O CONIDIOS (Spore = semilla): son células uni o plurinucleadas, de aspecto hialino o pigmentado (azul, verde, amarillo, rojo, negro) y son éstas las que dan el color a las colonias o micelios. Cuando se originan de forma sexuada (por fusión de gametos) se denominan esporas y si su origen es de tipo asexuado (esporulación o fragmentación) se llaman conidios.

La morfología de las esporas (o conidios) es bastante variable y características de cada especie de hongo. Las esporas pueden ser:

- a) Según forma: ovales, elípticas, estrelladas, fusiformes, helicoidales, piriformes, etc.
- b) Según la presentación de tabiques o septos:
 - Amerospora: ausencia de tabiques (Aspergillus, Penicillium, Mucor)
 - Didimospora: presencia de 1 sólo tabique (Trichothecium)
 - Fragmospora: presencia de varios tabiques transversales (Microsporum, Fusarium)
 - Dictiospora: presencia de tabiques longitudinales y transversales (Alternaria)

IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS

A diferencia de las bacterias que se identifican por sus propiedades bioquímicas, los hongos filamentosos se identifican por las características macroscópicas de las colonias y observación microscópica de las estructuras fúngicas características de cada especie.

CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS A CONSIDERAR:

- a) Velocidad de crecimiento: variable entre 1 a 3 semanas
- b) Aspecto de las colonias:
 - Algodonosas: *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichophytonrubrum*, *Alternaria*
 - Lanosas: *Microsporumcanis*
 - Pulvulentas: *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*
 - Céreas: *T. schoeleinii*
 - Velloso: *Aspergillus*, *Botrytis*
 - Aterciopelada: *Penicillium*
 - Yesosa, etc
- c) Color del micelio aéreo o reproductivo
 - Blanco: *Mucor*, *Rhizopus*, *T. rubrum*
 - Violeta intenso: *T. violaceum*
 - Tonos Beige o amarillos: *Aspergillus*
 - Tonos verde azulados: *Penicillium*
- d) Difusión de pigmentos: en general al comenzar a crecer los hongos producen pigmentos de color amarillo cafésoso, que puede difundir al medio y se observan en el reverso de la colonia.
 - Pigmento rojo vinoso: *T. rubrum*
 - Amarillo anaranjado: *M. canis*

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS A CONSIDERAR

Si se trata de hongos levaduriformes se hace una preparación entre lámina y laminilla semejante a la realizada con las bacterias.

Si se trata de hongos filamentosos o miceliados, se realiza un montaje tomando una pequeña porción de la colonia (en algunos casos incluyendo el agar) mediante un asa de cultivo en forma de L (gancho), la cual se deposita en un portaobjeto sobre una gota de lactofenol. Cubrir

con un cubreobjeto y presionar para disgregar el agar y la colonia. Observar al microscopio con lentes secos y de inmersión.

En raras ocasiones se usan colorantes para hongos, uno de lo más conocidos es el de Gueguen que tiene la ventaja de colorear las grasas en anaranjado, el glicógeno en pardo caoba y el almidón en violeta.

- El micelio vegetativo y reproductivo tienen poca importancia en la identificación de las especies de dermatofitos, ya que todos tienen hifas hialinas septadas, por lo tanto sólo se pueden identificar observando:

1. Formas de reproducción Asexual

- Microconidios: conidios originados lateralmente a las hifas, pedunculados, pequeños, unicelulares
- Macroconidios: conidios grandes, multicelulares, con tabiques transversales

2. Formas de reproducción Sexual

- Zygospora
- Ascas y Ascocarpos (cleistotecios, apotecios, peritecios)
- Basidios y Basidiocarpos

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. DENTON, M.; WILCOX, M.H.; PARNELL, P.; GREEN, D.; KEER, V.; HAWKEY, P.M.; EVANS, I.; MURPHY, P. Role of environmental cleaning in controlling an outbreak of *Acinetobacter baumannii* on a neurosurgical intensive care unit. *J Hosp Infect.*, v.56, p. 106-110, 2004.
2. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182008000100011&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0716-1018.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182008000100011>. 2008.
3. FERNANDES, A.T. et al. *Infecciones Hospitalaria e suas interfaces na Área da Salud*. Son Paulo: Atheneu, 2000.
4. GARNER, J.S. The hospital infection control practices advisory committee. Guideline for isolation precautions in hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v.17, p. 54-80, 1996.
5. *Introducción a la Microbiología Clínica*.
<http://www.monografias.com/trabajos16/microbiologia-clinica/microbiologia-clinica.shtml#CONCEPT>.
6. MIRANDA C, MARCELO Y NAVARRETE T, LUZ. Semmelweis y su aporte científico a la medicina: Un lavado de manos salva vidas. *Rev. chil. infectol.* [online]. Vol.25, n.1 [citado 2013-12-17],pp.54-57.
7. NOSKIN, G.A.; BEDNARZ, P.; SURIANO, T.; REINER, S.; PETERSON, L.R. Persistent contamination of fabric covered furniture by vancomycin-resistant enterococci: implications for upholstery selection in hospitals. *Am J Infect Control*, v.28, p.311-313, 2000.

8. OLIVEIRA, A. Infecciones Hospitalares, Epidemiologia, Prevención e Control. Rio de Janeiro: Medsi. p. 290. 2005.
9. PELCZAR, M.J. et al. Microbiologia, conceitos e aplicações. Son Paulo: Makron Books, 1997.
10. RAY A.J; HOYEN C.K; DAS S.M; TAUB, T.F; ECKSTEIN, E.C; DONSKEY, C.J. Nosocomial transmission of vancomycin-resistant enterococci from surfaces. JAMA, v. 287, p. 1400-1401, 2002.
11. SAMPLE, M.L; GRAVEL, D.; OXLEY, C.; BALDWIN, T.; GARBER, G.; RAMOTAR, K. An Outbreak of Vancomycin-Resistant Enterococci in a Hematology-Oncology Unit: Control by Patient Cohorting and Terminal Cleaning of the Environment. Infection Control and Hospital Epidemiology, v.23, p.468-469, 2002.
12. SILVIA I. ACOSTA-GNASS Y VALESKA DE ANDRADE STEPLIUK. “Manual de esterilización para centros de salud”. Organización Panamericana de la Salud. http://www.paho.org/PAHO-USAID/dmdocuments/AMR-Manual_Esterilizacion_Centros_Salud_2008.pdf. 2008.
13. ZAMBRANO, FERNANDO., NUÑEZ , CLAUDIA, GARCIA ALFONSO. Guia Práctico N° 1 Bioseguridad, Santiago. 1996.
14. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0b/PhylogeneticTree,_Woese_1990.PNG/400px-PhylogeneticTree,_Woese_1990.PNG
15. http://es.wikipedia.org/wiki/Higiene_de_manos.
<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.es>
16. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Autoclave%281%29.JPG>.
17. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Melag_Autoclave_01.JPG

18. http://educativa.catedu.es/44700165/aula/archivos/repositorio/3250/3408/html/22_pared_bacteriana.html