

22/11/01

BACTERIOLOGÍA

Estudio de las bacterias y enfermedades que éstas provocan. Queda incluida la cadena epidemiológica (reservorio, mecanismos de transmisión, inmunidad, factores que hacen que existan más o menos defensas contra ellas...). Las bacterias son seres microscópicos estudiadas mediante microscopios ópticos en preparaciones teñidas o sin teñir (en fresco) para estudiar su estructura o morfología, pero para estudiar su estructura interna se necesita un microscopio electrónico.

ESTRUCTURA BACTERIANA

- PARED CELULAR.

Es una característica de las bacterias y es una pared que está por encima de la membrana citoplasmática con función exoesquelética. La pared tiene poros y es una parte morfológica que tienen TODAS las bacterias ya que es importante para su supervivencia porque incluso la presión osmótica interna hace que la pared le dé una rigidez. A veces algunas bacterias pierden esta pared y se convierten en PROTOPLASTOS.

Hay unas bacterias (sólo de un tipo) que NO tienen pared celular: las del género *Mycoplasma* que tiene 2 especies:

- *M. Hominis*
- *M. Pneumonie*

Son las únicas bacterias que no tienen pared celular.

Familia: Mycoplasmae

Género: *Ureoplasma* (con pared) – *Mycoplasma*

Especie: *M. hominis* *M. Pneumonie*

El mucopéptido (polímero) más importante que forma la pared celular y el más característico de las células procariotas es la MUREÍNA, la célula sintetiza esta mucoproteína para hacer su pared y hay antibióticos que actúan sobre la pared celular inhibiendo la producción de la proteína.

- MEMBRANA CITOPLASMÁTICA.

Vital para la supervivencia de TODAS las células. Es semipermeable (sometida a las leyes de la OSMOSIS). Está formada por una estructura de lípidos (bicapa fosfolípida) y proteínas.

- CITOPLASMA.

Donde se encuentran las sustancias internas, orgánulos, ribosomas (encargados de la síntesis de proteínas), inclusiones citoplasmáticas (algunas de ellas pueden ser cromáticas, pueden tener color), vacuolas...

- CÁPSULA.

ALGUNAS bacterias pueden formarla.

CLASIFICACIÓN BACTERIANA.

Las especies están divididas en CEPAS y CLONES.

- Cepa: cultivo puro derivado de 1 SOLO aislamiento (grupo de gérmenes)
- Clon: cultivo formado por los descendientes de 1 SOLA bacteria (1 sólo germen)

En una cadena epidemiológica es muy importante saber cuál es el FOCO de infección original, si es de una misma cepa o de diferentes para investigar su diseminación en la población. Hay una CEPA TIPO que a partir de ella se hacen las comparaciones y se conocen las características y a partir de ella también se clasifican el resto.

Las ESPECIES también se acaban dividiendo en subespecies, etc. Todo esto es importante desde el punto de vista epidemiológico para saber el origen de las especies y saber en qué han variado como p.ej. patogeneidad, etc...

Todas estas clasificaciones se hacen de acuerdo a muchos criterios y características:

- Fenotípicas (que se manifiestan):

Genotipo: gen que contiene info de las características

Fenotipo: es lo que manifiesta en el organismo

- Genotípicas
- Fisiológicas (unas necesitan una temperatura de crecimiento determinado, otras son sensibles a unos ambientes...)
- Nutricionales (heterótrofos, autótrofos)
- Características de afinidad al medio de cultivo
- Bioquímicas (pH, iones...)
- Tinción (gram +, gram -)
- Estructurales

Hoy en día, la forma más usual, aunque nueva, de clasificación es la GENÉTICA (características Genotípicas). A través de la cual se ha conseguido que las bacterias tengan unas similitudes muy importantes (70–80%). Pero las clasificaciones bacterianas siguen siendo muy variadas, van cambiando y actualizándose.

02/12/01

CARACTERÍSTICAS DE TODAS LAS BACTERIAS.

- Mureína
- Membrana plasmática
- Pared celular (tinciones de gram...)
- Citoplasma

Otras características que unas sí tienen y otras no:

- Cápsula
- Cilios

METABOLISMO DE LAS BACTERIAS

A través del metabolismo de las bacterias también se puede hacer una identificación bacteriana. El metabolismo comporta un cambio y con esta palabra se designan una serie de transformaciones que tienen lugar dentro de la célula. Se produce en dos partes:

- Anabolismo: procesos de construcción celular, biosíntesis
- Catabolismo: constituido por las reacciones energéticas con el fin de obtener energía química ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}$), se desprende energía, que se obtiene de los nutrientes, como la luz, etc.

Las reacciones metabólicas (metabolismo) son comunes a TODAS las células de todos los seres vivos. Pero para ello la célula necesita:

- **MACRONUTRIENTES.**

- CARBONO (C): La mayor parte de las bacterias necesitan una fuente de carbono y de ahí que muchas bacterias utilicen una fuente de CO_2 como fuente de carbono.
- NITRÓGENO (N): lo necesitan para formar AA de las proteínas.
- FÓSFORO (P): para la síntesis de los ác. Nucleicos, fosfolípidos, ATP...
- AZUFRE (S): ya que forma parte de las moléculas de algunos AA como la Cisteína, Metionina...
- POTASIO (K): activador de algunos encimas.
- MAGNESIO (Mg): interviene en la estabilización de los ribosomas, membrana celular, ác. Nucleicos...
- SODIO Y CALCIO (Na, Ca): algunas bacterias los necesitan pero normalmente las patógenas no.
- HIERRO (Fe): en muchas de las bacterias es importante para el ciclo respiratorio.
- AGUA (H_2O): nutriente muy importante, sin ella las bacterias no pueden completar su ciclo vital. Si no disponen de agua, algunas pueden dar lugar a formas de resistencia y esporular, viviendo de forma latente.

- **MICRONUTRIENTES. OLIGOELEMENTOS.**

Elementos químicos indispensables para el crecimiento bacteriano, se requieren en cantidades muy pequeñas, funcionan como antioxidantes.

- COBALTO (Co): forma parte de la vitamina B12
- ZINC (Zn): para varios encimas
- COBRE (Cu): forma parte de los encimas respiratorios
- Mg
- En algunas bacterias especiales: Niquel, Tugsteno, Selenio...

Además de estos dos tipos de nutrientes, la bacteria también necesita para su metabolismo FACTORES DE CRECIMIENTO: compuestos que se requieren en muy pequeñas cantidades y que normalmente la célula es capaz de sintetizarlos, pero a veces los necesitan tener en el medio que les rodea, como p.ej. las vitaminas, que se ponen más de manifiesto cuando los cultivos son sintéticos, ya que en c.n. las bacterias los pueden sintetizar o los tienen ya el medio.

La necesidad de algunos factores de crecimiento específico puede ser una característica de una especie bacteriana.

OBTENCIÓN Y LIBERACIÓN DE ENERGÍA EN LAS BACTERIAS.

CLASIFICACIÓN EN GRUPOS NUTRICIONALES

SEGÚN SUS FUENTES DE ENERGÍA Y DE CARBONO.

- Fotoautótrofas (fuente C es CO₂ + luz)
- Fotoheterótrofas (fuente de C es un compuesto orgánico + luz)
- Quimioautótrofas (CO₂ + sales orgánicas)
- Quimiheterótrofas (compuestos orgánicos + compuestos orgánicos)

	Fuente de Carbono	Fuente de Energía
Fotoautótrofo	CO ₂	LUZ
Fotoheterótrofo	Compuestos orgánicos	LUZ
Quimioautótrofo	CO ₂	Sales orgánicas
Quimiheterótrofo	Compuestos orgánicos	Compuestos orgánicos

La energía se acumula en forma de ATP y todo se hace mediante reacciones de oxidación y reducción (REACC. REDOX), que en muchas de ellas va a haber una participación de oxígeno, pero en otras no, y dependiendo de ello, el metabolismo bacteriano libera energía mediante:

- Fermentación (en ausencia de O₂, hay pérdida de electrones)
- Respiración (en presencia de O₂, por adición de electrones)

	Fuente de Energía	Liberación de Energía
Fermentación	Es la glucosa, degradada por la bacteria	Se libera poca energía
Respiración Glucosa+O₂--ATP+H₂O	Es el O ₂ el que actúa como aceptor de electrones (es el que se reduce)	La oxidación de la glucosa entra en el ciclo de Krebs y se produce aquí más ATP.

10/12/01

CONTROL DE CRECIMIENTO

ESTERILIZACIÓN: Es un procedimiento que destruye o elimina todas las formas de vida: gérmenes saprófitos, patógenos, esporas, virus, hongos...

DESINFECTAR: sin gérmenes patógenos y aplicado a objetos sin vida. Son productos que se pueden aplicar directamente en la piel. El alcohol, p.ej. es un desinfectante, y el que se usa es el de 70° no el de 90°.

Para controlar el crecimiento bacteriano se utilizan varios sistemas y dentro de los agentes bacterianos: bacteriostáticos (inhiben el crecimiento bacteriano), fungistáticos, virustáticos, microbiostáticos... (que inhiben el crecimiento). Los que destruyen a los gérmenes son los llamados: microbicidas, bactericidas, fungicidas.

Hay dos sistemas de Esterilización:

• MÉTODOS FÍSICOS.

• CALOR HÚMEDO

- **AUTOCLAVE:** es el método más utilizado y uno de los más eficaces, cómodo y barato. El agua a temperatura elevada mata a los microorganismos ya que desnaturaliza y coagula sus proteínas. El tiempo que se necesita depende de la naturaleza del microorganismo, el medio, cantidad... Lo calculado es unos 121° durante 20 minutos para que la esterilización sea eficaz y para conseguir esta temperatura hay que aumentar la presión.

- **TINDALIZACIÓN:** es una esterilización con vapor (también calor húmedo) pero fraccionado, se hace con materiales que no soportan temperaturas tan altas como las del Autoclave. Subimos la

temperatura hasta 90–100° y después se incuba para que las formas vegetativas crezcan y se vuelve a poner el calor a 90–100° para que mueran todas las formas adultas, se para y se vuelve a poner a 90–100°.

- **PASTEURIZACIÓN:** es una forma también de esterilización con calentamientos inferiores a 100° (durante 30 minutos, a 60–70° y no a 75° durante 15 minutos).
- **EBULLICIÓN:** como tal, sin más, es muy efectivo con los gérmenes pero no con las formas vegetativas (esporas).
- **CALOR SECO:**
- **INCINERACIÓN:** quemar
- **FLAMBEADO:** con el Bunsen. El inconveniente es que produce aerosoles y al trabajar con él nos podemos quemar. Hay que tener cuidado con las muestras de esputo. Para sustituirlo se utilizan unos tubos con resistencia donde dentro se mete el asa.
- Se debe seguir trabajando siempre alrededor de la llama para crear un campo estéril de trabajo pero no poner la mano delante para evitar salpicaduras de los aerosoles y utilizar asas desechables.
- **HORNOS:** Esterilizan objetos de vidrio, metal y para algunas sustancias grasas, insolubles en agua, no volátiles que permiten este sistema. Es menos eficaz que el calor húmedo y el tiempo de exposición depende de la temperatura del aire:

A 170° C: 1h 150° C: 2,5h

160° C: 2h 140° C: 3h

17/12/01

- **ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN**

Método eficaz para filtrar líquidos. SE hace pasar el líquido por un embudo que tiene un filtro con unos poros lo suficientemente pequeños para retener los microorganismos (pero NO los virus).

Estos filtros suelen estar hechos por membranas de Nitrato o Acetato de celulosa que suelen tener poros de unos 0,45 μ m de diámetro, y por este tamaño hay gérmenes que pasan (p.ej. Pseudomona, Serratia...) por eso a veces se recomienda la utilización de filtros con poros más pequeños de 0,22 μ m de diámetro ya que tienen más dificultad de filtración.

Son filtros con los que se hace una presión para que el filtrado sea más rápido con un matraz quitasato:

Es un sistema práctico y adecuado sobre todo cuando se quiere esterilizar líquidos que no permiten ser sometidos a elevadas temperaturas. El sistema de esterilización por filtrado no sólo es usado para estos líquidos sino también para el aire: CAMPANAS DE FLUJO LAMINAR.

Eliminan el 99% de partículas de un diámetro mayor a 0,3 μ m. Con gérmenes patógenos, las cabinas utilizan flujo laminar horizontal empujando el aire estéril hacia el exterior. En un laboratorio de microbiología se utilizan campanas de flujo laminar como sistema de esterilización del aire con filtros HEPA que filtran partículas con un diámetro mayor a 0,3 μ m.

- **Gérmenes patógenos:** campanas de flujo laminar que proyecta una cortina vertical de aire estéril.
- **Controles de esterilidad:** se emplea cabinas de flujo laminar horizontal que empujan el aire estéril hacia el exterior y evitan la contaminación ambiental de las muestras.
- **RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA.**

Todas ellas (, , Rx, UV) pueden matar microorganismos y todas ellas también se dividen en dos grupos:

- Rad. Ionizantes (rayos Rx y rayos)
- Rad. NO Ionizantes

- **RADIACIONES IONIZANTES.**

Tienen suficiente energía para ionizar las moléculas produciendo radicales hidróxilos [OH⁻] que son muy reactivos, y así destruyen el ADN, proteínas y matan a las células (microbios). Tienen un gran poder de penetración lo que permite que se puedan utilizar para la esterilización de productos después de que éstos estén embalados.

Los Rx se paran con el plomo (Pb) y los R son más penetrantes. Se emplean bastante con materiales de plástico embalados. Según las longitudes de onda () de los mismos:

: 0,01 – 100 nm rad. Ionizantes

: 136 – 400 nm rad. No ionizantes

- **RADIACIONES NO IONIZANTES.**

Como los UV, es una radiación absorbida por los compuestos intracelulares produciendo la excitación de los electrones de las moléculas y modificando su reactividad. La estructura celular más afectada es el ADN y esto puede matar a la célula y afectarla como radiaciones esterilizantes mediante las luces de UV de unos 260 nm (). Todos los rayos UV tienen una reacción mutágena sobre las cadenas de ADN.

Un inconveniente respecto a la esterilización es que tienen muy poco poder de penetración, sólo son utilizable contra gérmenes de superficies de objetos y esterilizar estancias, aire de zonas estériles, etc... También son radiaciones acumulables como las ionizantes y por ello hay que trabajar con métodos de aislamiento y protección para evitar contaminación.

- **MÉTODOS QUÍMICOS DE ESTERILIZACIÓN.**

La esterilización química se utiliza mucho para instrumental médico que no se ha de someter a las altas temperaturas del autoclave, y para zonas cerradas donde sea necesario la ausencia de microorganismos como p.ej. un quirófano. El laboratorio de microbiología en un hospital está muy relacionado con el laboratorio de epidemiología y son responsables del estado de esterilización de los quirófanos y de las contaminaciones e infecciones hospitalarias. Uno de los métodos químicos utilizados es:

- **ÓXIDO DE ETILENO.**

Gas líquido a temperatura inferior a 10,8° C. Tiene el inconveniente de que es muy tóxico e irritante y muy inflamable incluso aunque se use a muy baja concentración []. Se suele usar mezclado con CO₂ que facilita la manipulación del óxido de etileno pero no reduce su capacidad microbicida. Tiene una importante capacidad de penetración, puede atravesar paquetes de ropa, embalajes e incluso algunos plásticos.

El inconveniente es que se necesitan varias horas de exposición porque su acción es muy lenta y se necesita también bastante tiempo de aireación. Para esterilizar con óxido de etileno se utilizan una especie de autoclaves que controlan la [] del gas, la temperatura y la humedad. Su mecanismo de acción es inactivando enzimas mediante una reacción de los grupos sulfidrilos. También es un método más caro.

- **– PROPIOLACTONA.**

Líquido incoloro a temperatura ambiente, no es inflamable pero produce irritación ocular y ampollas por contacto con la piel. Es más rápido que el anterior pero se utiliza poco por su escaso poder de penetración y porque es cancerígeno.

- **GLUTERALDEHIDO.**

Líquido oleoso, incoloro que en solución acuosa al 2% es microbiocida y se utiliza en los hospitales para esterilizar instrumentos urológicos, con lentes, aparatos de terapia respiratoria, endoscopia...

- **FORMALDEHIDO.**

Gas estable a elevada [] y temperatura. Es muy tóxico y sus vapores son muy irritantes para las mucosas. Se usa para esterilizar algunos instrumentos y en forma de gas se utiliza para esterilizar zonas cerradas. Uno de sus inconvenientes es su escaso poder de penetración. Su actividad microbiocida es debida a su capacidad de inactivar componentes celulares como proteínas y ácidos nucleicos.

10/01/02

DESINFECCIÓN

No confundir la desinfección con la esterilización ya que son conceptos distintos. La antisepsia-antiséptico es la desinfección sobre los seres vivos, p.ej. la piel.

- Asepsia: sin organismos, no contaminación
- Antisepsia: sin organismos patógenos mediante productos desinfectantes y antisépticos.

DESINFECTANTES QUÍMICOS.

- **ALCOHOLES.**

Son desnaturalizantes de las proteínas y matan las células pero sólo cuando se aplican en disolución al 70%. Además de matar células vegetativas, inactivan las esporas y algunos virus. Si utilizamos alcohol al 100% necesita actuar dentro de la célula junto con agua. Según su utilización lo tendremos que diluir:

- Para desinfectar: diluir al 70% (etanol, isopropanol)
- Para desengrasar portas: al 100% seca mejor.

Aunque actúan de forma rápida su efecto no es instantáneo. El alcohol isopropílico tiene mayor poder germicida que el alcohol etílico y también es menos corrosivo sobre los instrumentos pero tiene el inconveniente de que tiene un olor picante (irrita más las mucosas) y por eso usamos más el etanol. El metanol es un alcohol muy tóxico y venenoso que se usa para el mechero, etc. El etílico se usa para las bebidas alcohólicas y en el laboratorio (desnaturalizado)

- **DESINFECTANTES ALÓGENOS.**

Son muy empleados, pero con el inconveniente de que se inactivan en presencia de material orgánico. Entre ellos:

- Yodo (mezclado también con alcoholes)
- Cloro (sobre todo en la potabilización del agua, al reaccionar con los compuestos orgánicos los inactiva)

- SALES DE METALES PESADOS.

- Sales de mercurio (mercurocromo)
- Óxido de zinc (para algunas infecciones)
- Nitrato de plata (corrosivo, para cauterizar)

PROPIEDADES IDEALES PARA DESINFECTANTES

Y ESTERILIZANTES QUÍMICOS.

- Elevado poder germicida (que mate los gérmenes y las esporas, virus y toda forma de vida) y en soluciones muy diluídas.
- Que sea estable en el tiempo y sobre todo en presencia de materia orgánica.
- Soluble en agua.
- Que no sea tóxico para las células de los seres vivos superiores.
- Que no sea corrosivo.
- Que tenga una buena capacidad de penetración.
- Que sea económico.

FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA EFICACIA

DE LA DESINFECCIÓN QUÍMICA

En relación tanto con el desinfectante químico, las bacterias o con ambos.

- Factores del desinfectante químico.
 - Naturaleza del desinfectante
 - Capacidad de ionización
 - Su concentración
 - Capacidad de solubilizarse en la célula
 - Afinidad por el protoplasma de la célula y los constituyentes celulares
- Factores de las bacterias (gérmenes en general)
 - Especie del microorganismo y de su composición química
 - Fase de crecimiento en la que se encuentra
 - Estructuras que puede poseer: esporas, flagelos...
 - Antecedentes del cultivo del germen
 - Número de bacterias presentes
- Factores en ambos.
 - La temperatura (cuanto más alta, mejor se lleva a cabo la desinfección)
 - Todos los fenómenos de superficie:
 - Tensión superficial
 - Absorción
 - Permeabilidad
 - Adsorción
 - Difusión...
 - pH (factor muy importante)
 - Presencia de material orgánico (también muy importante) porque puede neutralizar y evitar que el

desinfectante llegue a la célula

- Presión (importante sobre todo en el caso de que el desinfectante sea un gas)
- El tiempo de exposición

Para evitar que el desinfectante llegue a ser inactivado en presencia de material orgánico se puede llevar a cabo los siguientes pasos:

- limpiar primero el material a desinfectar o esterilizar
- meterlo en el autoclave

O bien:

- Colocar el material inmerso en una sustancia desinfectante (p.ej. glutaraldehído, lejía...)
- Se limpia el material
- Se introduce en el autoclave para su esterilización.

14/01/02

CONTROLES DE ESTERILIZACIÓN

La esterilización es eficaz cuando realizamos unos controles de esterilización que pueden ser químicos, físicos o mecánicos y biológicos.

- QUÍMICOS.

Son de varios tipos:

- CINTAS ADHESIVAS.

Que se utilizan tanto en calor seco, húmedo, como en óxido de etileno y que su función puede ser además de control de esterilización al cambiar de color. Es un método eficaz, pero también tiene la función de poder precintar el paquete y poner la fecha, personal responsable que ha realizado la esterilización y lote para saber quien ha llevado a cabo el ciclo. Los controles ya indican para qué sistemas de esterilización son válidos.

- EN LAS MISMAS BOLSAS DE ESTERILIZACIÓN.

Son bolsas de esterilización donde se introduce el material a esterilizar y que poseen en su cara posterior unas marcas donde indican ya el color al cual tiene que cambiar si el ciclo ha sido correcto (observar siempre), la fecha de caducidad y el tipo de esterilización que se puede utilizar.

- LÁMINAS Y ETIQUETAS.

Pueden ser sueltas o adhesivas, se archivan los datos para su control. Puede tener el dibujo de una flecha o un rectángulo que es donde tiene el cambio de color.

- Existe un sistema que en vez de rectángulos o flechas que cambian de color tiene varias zonas que cambian de color por motivos diferentes (presión, temperatura, tiempo...) y son más específicos ya que indican las diferentes fases de los procesos de esterilización, con la ventaja (sobre TODOS los métodos anteriores) de que son más fáciles, cómodos e indican las fases de esterilización.

- CONTROLES MECÁNICOS O FÍSICOS.

Ya el mismo aparato conectado informáticamente hace el control de fallos en el proceso de esterilización. Pero también se utilizan unos relojes o gráficas que se colocan en el esterilizador donde indican los problemas que pueden haber ocurrido y también se guardan como información. El inconveniente es que te indican el tiempo, presión y temperatura que se han llevado a cabo pero no se sabe si ha sido efectivo en todas las zonas del autoclave, si ha llegado a todos los lugares. Por eso, para mayor seguridad, se suelen complementar todos los métodos de control.

- **CONTROLES BIOLÓGICOS.**

No se utilizan en todos los ciclos sino en controles de calidad de vez en cuando. Consisten en introducir en el esterilizador ESPORAS VIVAS y comprobar una vez terminado el ciclo de esterilización si éstas han sido destruidas. Las esporas normalmente van introducidas en ampollas con un caldo de cultivo que contienen un indicador de pH que cambia de color cuando los gérmenes crecen.

El inconveniente es el tiempo.

MANEJO DEL MATERIAL ESTÉRIL

- Al sacar el material estéril del autoclave no se puede contaminar (tocar)
- Trabajar con placas estériles
- Mechero Bunsen
- No echar el caldo de cultivo fuera de las placas ni desbordarlas ya que se consideran entonces contaminadas
- No tocar partes internas ya que se consideran campos estériles.

ANTIBIÓTICOS

- Para eliminar bacterias patógenas
- Hacer medios de cultivo selectivos (germen sensible a ese antibiótico)

Los antibióticos tienen diferentes mecanismos de actuación:

- Antimicrobianos que actúan sobre PARED CELULAR
- Antimicrobianos que actúan sobre MEMBRANA CITOPASMÁTICA
- Antimicrobianos que inhiben SÍNTESIS PROTEICA
- Antimicrobianos que inhiben SÍNTESIS ÁCIDOS NUCLEICOS
- Antimicrobianos que interfieren en VÍAS METABÓLICAS
- Antimicrobianos inhibidores de ÁCIDOS MICOLÍTICOS

FUNCIONAMIENTO DEL AUTOCLAVE

- Presión = temperatura > 100° C
- Conocer los materiales que soporten los 120°C y el calor húmedo
- El material tiene que estar ya limpio (descontaminado) la mayoría de las veces, pero a veces se colocan las placas de petri sucias con un ciclo de esterilización para luego ser desechadas, o los medios de cultivo preparados para esterilizar y repartirlos por las placas después.
- También los materiales tienen que estar envasados de una determinada manera, p.ej. envolver en fardos de ropa o meterlos en bolsas de sellados para esterilización, con la ventaja de que a temperatura ambiente los poros de éstas últimas están cerrados pero dentro del autoclave se abren y entra el vapor
- El autoclave tiene dentro una especie de cesto donde se pone lo que se quiere esterilizar y luego se introduce la cantidad de agua. Cerrarlo y dar el ciclo de esterilización. La salida del agua tiene que

estar bien cerrada y sólo dejar salir el aire

- Al aumentar la temperatura del agua, aumenta también la presión del vapor por estar cerrado y se expulsa el aire que había de dentro del autoclave haciendo que aumente más la presión
- Muchos autoclaves están conectados a un programa informático con los que se puede observar y controlar que según va aumentando la presión del vapor del agua va aumentando también la temperatura hasta 120° C y se hace el ciclo de esterilización.
- Cuando se termina el ciclo, el autoclave no se puede abrir hasta que la presión interna sea igual a cero
- Para hacer medios de cultivo es indispensable el autoclave, tanto para desechar las placas como para esterilizar los medios de cultivo.

17/01/02

ORGANIZACIÓN DE UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Existen varias secciones diferentes:

- SECCIÓN DE TOMA DE MUESTRAS.

Muestras de pacientes ambulatorios. Siempre tiene que haber el material disponible para la toma de muestras y buenas condiciones de esterilidad, reposición, etc. Pueden ser muestras de diferentes tipos aunque las de sangre se hacen en un lugar común de EXTRACCIÓN. Hace falta una buena iluminación y el lavado de manos.

- SECCIÓN DE RECEPCIÓN Y REGISTRO DE MUESTRAS.

Cuando se reciben las muestras hay que registrarlas, se etiquetan y se organizan correctamente con las peticiones (que coincidan los números de las etiquetas). Es muy grave que se confundan las muestras y analíticas entre pacientes.

Es importante hacer una primera evaluación del estado de la muestra, ya que con ellos ya se rechazará todo lo que no tenga un estado correcto para su estudio: desechar las muestras que no cumplan unos requisitos de seguridad.

- SECCIÓN DE SIEMBRA DE MUESTRAS.

Para realizar los medios de cultivo están los protocolos (PNT) de trabajo de cada tipo de cultivo y siembra de muestras para su estudio. Son secciones más o menos conectadas entre sí y con el resto de áreas.

- SECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

Pueden estar más o menos separados. Son los lugares donde se preparan los medios de cultivo y suele ser la zona donde se produce la esterilización del material a usar y el material a desechar. En esta sección se tiene que proveer de una cámara frigorífica. Hoy en día muchos medios de cultivo se compran directamente hechos (si se necesitan en gran cantidad resulta más económico).

- SECCIÓN DE BACTERIOLOGÍA.

Se interpretan los cultivos, para ello se hace tinciones, pruebas de identificación bioquímica, pruebas inmunológicas. Es una zona donde se hará la identificación microscópica, se trabaja con urinocultivos, exudados, hemocultivos, coprocultivos (heces), etc.

- SECCIÓN DE MICOBACTERIAS.

Tiene que estar aislada del resto de secciones y cerrada con todos los mecanismos de prevención, es donde hay un paso restringido tanto para el personal de fuera como para los trabajadores del laboratorio.

- SECCIÓN DE MICOBIOLOGÍA.

Se estudia todo lo referente a los hongos.

- ANTIBIOGRAMA O SENSIBILIDAD BACTERIANA.
- SEROLOGÍA O INMUNOLOGÍA.

Requiere una mayor especialización y mayor infraestructura y se pueden encontrar en departamentos separados según la importancia del hospital o del Centro.

NORMAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

DE MICROBIOLOGÍA

Para evitar el riesgo de infección con las muestras y de su propagación a la comunidad, por ello existen unas normas muy estrictas (CDC, centro de USA: que establecen unas normas de seguridad).

Existen 4 niveles de seguridad biológica:

- NIVEL I. LABORATORIO DE ENSEÑANZA.

- Se trabaja con microorganismos NO patógenos, bien conocidos o patógenos oportunistas.
- Puertas cerradas, mesas que se desinfectarán.
- Todo el material contaminado debe ser esterilizado antes de ser desechado.
- NO pipetear con la boca, ni morder o chupar bolis, ni fumar o comer.
- Lavarse las manos antes y después de trabajar.
- Evitar producir aerosoles (a ves en el flambeado de las asas o al abrir un frasco)
- Llevar siempre bata, uso de guantes adecuadamente.
- Debe existir programas de desinfección y desratización porque se transmiten los gérmenes de un lugar a otro.
- Ventanas protegidas con mosquiteras y el diseño del laboratorio debe facilitar la limpieza y el almacenaje de productos inflamables.
- Secciones separadas tienen que tener un lavabo.

- NIVEL II. CENTROS DE ASISTENCIA PRIMARIA.

- Se trabaja con microorganismos de peligrosidad potencialmente moderada. Hay que seguir toda la normativa del Nivel I más la siguiente:
- Acceso al laboratorio restringido.
- En algunas zonas con productos más contaminantes hay que tener el cartel de riesgo biológico.
- Utilizar guantes en todas las técnicas en las que se manejen productos potencialmente peligrosos o con animales.
- En caso de accidente de exposición a productos contaminados hay hacer un informe y seguir todas las pautas establecidas de seguridad para poder aplicar el tratamiento si fuera necesario.
- Muestra de suero de todo el personal cuando empieza a trabajar.
- Todos deben conocer las normas de seguridad.
- Se trabajará en cabinas de seguridad cuando se realicen técnicas que supongan un grado de

producción de aerosoles o cuando haya que abrirse un recipiente con muestras de riesgo o agitaciones muy grandes.

21/01/02

- NIVEL III. MICROORGANISMOS DE ALTO RIESGO.

- Se sigue la normativa y precauciones del Nivel I y II y las siguientes:
- Todas las actividades con los microorganismos y los productos potencialmente patógenos se realizarán en cabinas de seguridad, no sobre las mesas de trabajo.
- Se utilizarán batas abiertas por detrás y nunca se saldrá con ellas fuera del laboratorio.
- Todo material de animales y productos hay que esterilizarlos antes de desecharlos.
- En el laboratorio no deben haber plantas o animales que no se utilicen en el trabajo.
- El laboratorio debe estar AISLADO de la circulación general que se consigue con una doble puerta y un habitáculo en medio donde podemos quitarnos la ropa y ducharnos.
- Los muebles deben ser de fácil limpieza, ventanas herméticas y puertas que cierren automáticamente. Y con un sistema especial de extracción de aire; el aire nunca debe circular de zona contaminada a zona no contaminada. Y este aire que se elimina al exterior ha de pasar por unos filtros de alta eficacia (HEPA).
- Cerca de las puertas de salida debe existir lavabos que se accionen con el pie, codo, etc. Y un autoclave en el propio laboratorio para descontaminar.
- Llevar mascarillas rígidas.

- NIVEL IV. LABORATORIOS DE EXPERIMENTACIÓN.

- Se manejan microorganismos de altísimo riesgo o microorganismos exóticos en un país determinado y especialmente con los virus.

21/01/02

CONTROL DE CALIDAD

En Microbiología se ha de establecer unos controles de calidad a todos los niveles:

- MUESTRAS.

Controlar las muestras desde su obtención, transporte, procesamiento y emisión de los resultados para lo cual lo ideal es elaborar y seguir un manual donde se especifica claramente la obtención de las muestras y su transporte (Protocolo).

Hay que establecer unos horarios estrictos de recogida de muestras y unos criterios muy claros de cuáles son las muestras que se van a desechar. También se ha de controlar la emisión de los resultados para no equivocarnos de paciente, trabajo, etc.

- MEDIOS DE CULTIVO.

Si están bien empaquetados y bien precintados y guardados en la nevera (4º C) la duración es de 8–10 semanas. Si están sin empaquetar la caducidad serán a las 2 semanas y los caldos de cultivo aproximadamente a las 4 semanas. Todos los medios de cultivo, sobre todo los que fabricamos nosotros, tienen que seguir unos controles de:

- Esterilidad (observar que en estufa no crece nada)

- Crecimiento (que crezca sólo lo que nos interesa)
- Características selectivas de los microorganismos en medios selectivos para aislar el germen que quiero (es una forma de aislamiento). ¿Cómo identificar un microorganismo?:

- Sembrar
- Aislar
- Observar macroscópicamente
- Observar al microscopio
- Identificar características bioquímicas (dependiendo de su metabolismo)
 - Calidad para el control de las características bioquímicas.
 - Control de los aparatos y utillaje (de TODOS).

Laboratorio

Control de calidad de la Generalitat

Nivel Nacional

Nivel Europeo

EE.UU.

- AIRE.

El aire actúa como medio de transporte de los microorganismos. Para el control ambiental del aire se siguen el siguiente procedimiento:

- Abrir placas de cultivo y mantenerlas abiertas donde se quiera hacer el control microbiológico. Cubrir una superficie de 1m² con placas y dejarlas abiertas durante 30 minutos.
- Los microorganismos sedimentan sobre la superficie del agar de las placas. Pasados los 30 minutos las volvemos a tapar y las incubamos a 30° C durante 24–48h.
- Ponemos a cultivar en la estufa de cultivo las placas y nos da una idea del número de microorganismos que existen en el ambiente porque NO permite un recuento exacto ya que no podemos saber el volumen de aire que se ha puesto en contacto con la placa.
- Una vez crecidos los microorganismos contamos el número de colonias y sumamos las de todas las placas y tendremos en número de UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) que tenemos por m² o: UFC/m²
- CONTROL AMBIENTAL MÁS ESPECÍFICO.

Podemos dar más exactamente las UFC/m² del aire ya que éste pasa a través de un tipo de aspiración que contabiliza la cantidad de aire aspirado.

- CONTROL DE SUPERFICIE.

Es un método antiguo. Nos podemos centrar en los pomos de las puertas y las superficies de trabajo. Encontramos diferentes gérmenes dependiendo de la superficie, como p.ej. los del suelo tienen capacidad de esporular, etc. El método es sencillo y consiste en:

- Colocar una plantilla estéril de papel de filtro con un recuadro de un 1cm² sobre la superficie que queremos estudiar.
- Frotar la zona del recuadro, que queda expuesta para su estudio, con un escobillón estéril humedecido en

solución salina.

- Introducir el escobillón en un tubo estéril con aproximadamente 2 mm de solución salina.
- Mover el tubo suavemente para que los microorganismos queden suspendidos en la solución salina.
- Coger una placa TSA (un medio de cultivo) y depositar sobre ella 0,1ml de muestra con una micropipeta o pipeta pasteur y lo extendemos todo por la placa: SIEMBRA EN MASA que se hace con una ASA DE DRIGALSKY (varilla acodada).
- Incubar a 30° C durante unas 48h, es a temperatura más baja que los gérmenes patógenos porque son gérmenes del ambiente y crecen más lentamente.
- Lectura de las UFC/m2.

En los laboratorios de Microbiología, la esterilización se lleva a cabo normalmente mediante:

- Vapor
- Calor
- Flameado

Los métodos de control de esterilización se usan todos juntos: los Físicos son obligatorios, los Químicos se usan siempre por norma y los Biológicos también en controles de calidad.

En los años 40 se descubrió el primer antibiótico natural: la PENICILINA que proviene de un hongo. Pero actualmente también existen antibióticos naturales, sintéticos y semisintéticos

- *Mycobacterias* Nivel III
- *Brucelas*
- Virus en general
- Priones Nivel IV

Para la frecuencia de los controles con CEPAS CONTROL, cada Centro tiene sus protocolos y personas encargadas de realizarlos. Estas cepas siempre provienen de un laboratorio de confianza

Cuando hay muchos gérmenes en la placa lo que se hace es un Banco de Dilución para saber los gérmenes que hay por cm2.