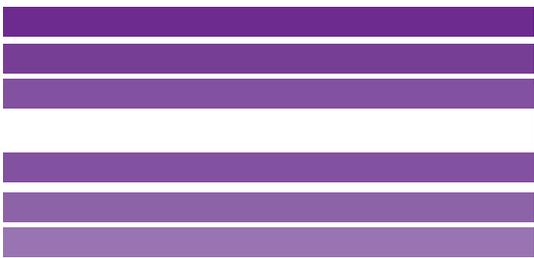


# **GUÍA DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO**

## **1° CUATRIMESTRE / 2da. Ed.**

**Cátedra de Microbiología e Inmunología / Plan 1992**  
**Carrera de Licenciatura en Genética / 2019**

**Gladis Jerke**  
**Marta A. Horianski**  
**M. Lorena Castrillo**  
**Miriam E. Chade**



**Colección: Cuadernos de Cátedra**



**Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales**

EDITORIAL UNIVERSITARIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

Coronel José Félix Bogado 2160  
Tel-Fax: 03764-428601

Correos electrónicos:  
direccion@editorial.unam.edu.ar  
Página WEB: www.editorial.unam.edu.ar

Colección: Cuadernos de Cátedra  
Coordinación de la edición: Nélide González  
Preparación para la web: Francisco A. Sánchez

Guía de prácticas de laboratorio, 1° cuatrimestre : cátedra de  
Microbiología e Inmunología plan 1992 : licenciatura en Genética /  
Gladis Jerke ... [et al.] ; coordinación general de Gladis Jerke. - 2a  
ed . - Posadas : Universidad Nacional de Misiones, 2019.  
Libro digital, PDF - (Cuadernos de cátedra)

Archivo Digital: descarga  
ISBN 978-950-766-136-5

1. Microbiología. 2. Inmunología. 3. Actividades Prácticas. I. Jerke,  
Gladis II. Jerke, Gladis, coord.  
CDD 579.078

ISBN: 978-950-766-136-5  
Impreso en Argentina  
©Editorial Universitaria  
Universidad Nacional de Misiones  
Posadas, 2019

# Trabajo Practico N° 1

## RECONOCIMIENTO DE MATERIAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

### OBJETIVOS

- Reconocer material, instrumental y equipos de laboratorio de microbiología.
- Conocer la utilidad/características de elementos, instrumental y equipos de laboratorio
- Conocer las normas mínimas de trabajo y bioseguridad en el laboratorio de microbiología

### 1.1. INTRODUCCIÓN

El trabajo de laboratorio es una tarea interesante y muy gratificante. No obstante, es necesario que antes de comenzar cualquier trabajo experimental, el alumno este familiarizado con los elementos que se han de manipular. Los elementos de laboratorio, podemos agruparlos en:

*Material de Laboratorio:* Algunos materiales son de uso general en laboratorios de prácticas biológicas o químicas, tales como pipetas, embudos y probetas. Mientras que otros son de uso más frecuente en laboratorios de microbiología, tal es el caso de placas de Petri y ansas. Cada uno de los materiales tiene una función determinada y su uso debe ser acorde con la tarea a realizar. La utilización inadecuada de este material podría dar lugar a errores en las experiencias realizadas y aumenta el riesgo en el laboratorio.

*Instrumental y equipos de Laboratorio:* Todo laboratorio requiere valerse de ciertos instrumentos y equipos para preparar los materiales a emplear y/o completar ensayos. Tal es el caso de termómetros, balanzas, estufas de cultivo o de esterilización, entre otros.

### 1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

Podemos entender por material de laboratorio el conjunto de utensilios e instrumentos de los que precisa un determinado laboratorio para poder llevar a cabo la investigación o experimentación, con el objeto de generar conocimiento y analizar el fenómeno de la realidad que se esté estudiando. Existe una gran variedad de tipos de laboratorio, cada uno de ellos precisan de material especializado en el ámbito de estudio en el que se trabaja: no precisa del mismo tipo de material un laboratorio de física que de química, por ejemplo. A continuación, nos enfocaremos a presentar el material de laboratorio más frecuentemente empleado en los laboratorios de prácticas de Microbiología.

En general, el material de laboratorio está construido de diversos materiales, en base a los cuales, podemos clasificarlos de la siguiente manera:

- Material de vidrio o Material de porcelana
- Material de plástico
- Material de Madera, goma o metal.

### **1.2.1.- Material de VIDRIO**

El instrumental de vidrio (tabla 1.1) utilizado para realizar investigaciones o reacciones químicas debe ser fabricado con materiales resistentes a la acción de los agentes químicos. El vidrio corriente no sirve para la fabricación de instrumentos de laboratorio por ser muy frágil y vulnerable a los agentes químicos y físicos.

Los instrumentos contruidos con vidrio grueso solo son apropiados para contener y trasvasar, si se intenta calentarlos se puede romper con mucha facilidad (ejemplo: embudos). Los instrumentos contruidos con vidrio delgado son muy resistentes al calor, pero solo cuando son calentados gradualmente y enfriados de la misma manera. Por eso se recomienda utilizar baño maría para calentarlos.

La mayoría del material de vidrio de laboratorio está contruidos con vidrio pirex o vidrio de borosilicato, que tiene una resistencia química muy buena; tanto al agua como a ácidos, soluciones de sal y disolventes orgánicos. Además, el vidrio pirex tiene una dilatación térmica baja y resiste altas temperaturas sin deformarse.

Ejemplos de material de vidrio: tubos de ensayo, vasos de precipitado, placas de Petri, Erlenmeyer, probetas graduadas, pipetas, embudos, entre otros.

### **1.2.2.- Material de PORCELANA**

Los instrumentos de porcelana se caracterizan por ser más resistentes que los materiales de vidrio y se utilizan por lo general, cuando se van a someter sustancias a elevadas temperaturas. Son utilizados cuando es necesario triturar o evaporar completamente el material.

Ejemplos de material de porcelana: morteros, espátulas, crisoles, embudos Buchner.

### **1.2.3.- Material de PLÁSTICO**

Los materiales de plástico utilizados en el laboratorio son elaborados con polímeros resistentes a ácidos, solventes orgánicos e hidróxidos.

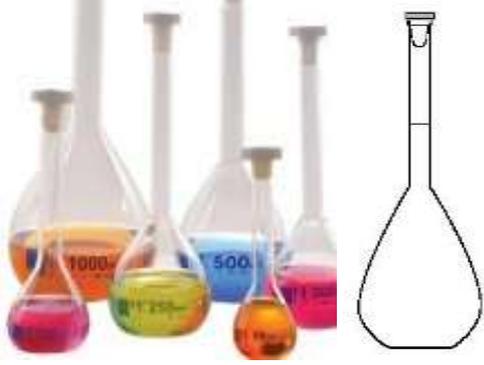
Ejemplos de material de plástico: frascos goteros, pisetas, placas de Petri, bidón, tips o puntas, entre otros.

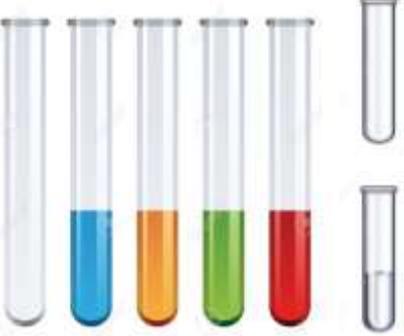
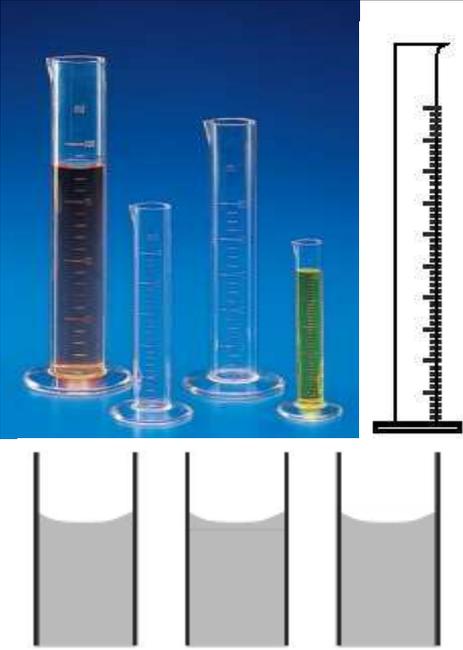
### **1.2.4.- Material de MADERA, GOMA y METAL**

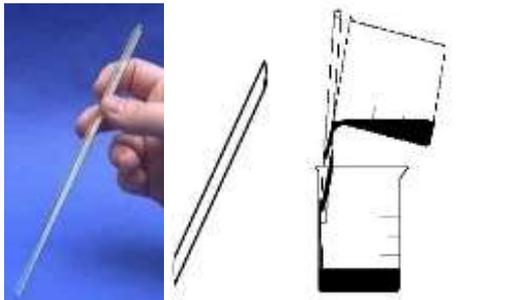
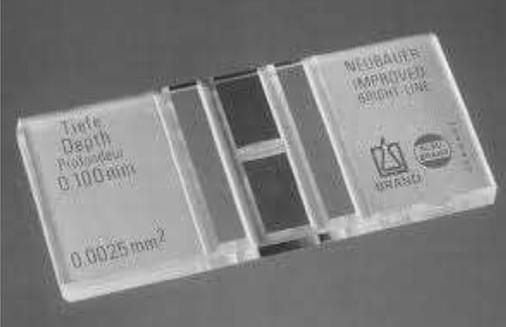
Los materiales de madera, goma o metal en el laboratorio se utilizan generalmente como medio de soporte y para manipular con facilidad otros objetos.

Ejemplos de material de madera, goma y metal: pinzas para tubos de ensayo, trípodes, gradillas, soportes, peritas, entre otros.

**Tabla 1.1. Material de vidrio utilizados en el laboratorio de microbiología**

MATERIAL DE VIDRIO	IMAGEN	UTILIDAD/USO
<p><b>Matraz aforado de fondo plano</b></p>		<p>Se utilizan para calentar líquidos con poca pérdida de evaporación y para construir generadores de gases.</p> <p>Son recipientes de vidrio, esféricos, provistos de un cuello, existen de diferentes volúmenes.</p>
<p><b>Erlenmeyer</b></p>		<p>Se utiliza para calentar líquidos, con poca pérdida de evaporación, hacer titulaciones y recristalizar un sólido.</p> <p>Es un recipiente de vidrio, tiene forma de cono y tiene un cuello cilíndrico, es plano por la base. Se utiliza para la preparación de medios de cultivos.</p>
<p><b>Embudo</b></p>		<p>Pieza cónica que se utiliza para trasvasar líquidos y para filtrar sustancias, utilizando papel de filtro.</p> <p>Puede haber de vidrio o plástico.</p>
<p><b>Matraz de succión o kitazato</b></p>		<p>Se utiliza para filtraciones al vacío con bomba de succión.</p>
<p><b>Vasos de precipitados</b></p>		<p>Elementos graduados utilizados para preparar o calentar sustancias y trasvasar. Pueden ser de vidrio o de plástico y de diferentes volúmenes. No son óptimos para medir volúmenes.</p>

MATERIAL DE VIDRIO	IMAGEN	UTILIDAD/USO
<b>Tubos de ensayo</b>		<p>Permite la preparación de soluciones en ensayos a pequeña escala. Pueden ser de vidrio o de plástico.</p>
<b>Probeta</b>	 <p>A B C</p> <p>Modo de enrase: A correcto; B y C incorrecto</p>	<p>Tubo de cristal alargado y graduado, cerrado por un extremo, usado como recipiente de líquidos o gases, el cual tiene como finalidad medir el volumen de los mismos. Elemento volumétrico. Puede ser de vidrio o de plástico.</p>
<b>Pipeta graduada</b>		<p>Elemento volumétrico que permite medir volúmenes precisos de líquidos que luego serán vertidos en otro recipiente. Hay de simple o doble aforo. Se usan con propipeta. Son generalmente de vidrio. Pueden ser de plástico.</p>
<b>Vidrio de reloj</b>		<p>Se utiliza para pesar sólidos, cubrir vasos de precipitado y evaporar gotas de líquidos volátiles.</p>

MATERIAL DE VIDRIO	IMAGEN	UTILIDAD/USO
<b>Varilla de vidrio</b>		Se utilizan para revolver y ayudar a disolver sustancias. Son útiles para trasvasar líquidos.
<b>Placas de Petri</b>		Se utilizan para la incubación y crecimiento de diferentes tipos de microorganismos dependiendo del medio de cultivo utilizado. Pueden ser de vidrio (reutilizables) o de plástico (descartables).
<b>Placa de recuento</b>		Se utiliza para realizar recuentos de diferentes partículas, como ser esporas fúngicas, hematíes o leucocitos.

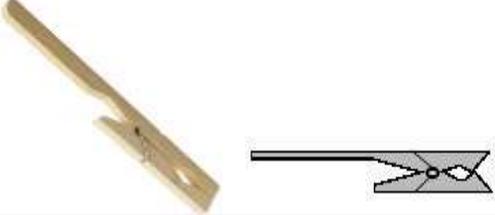
**Tabla 1.2. Material de porcelana utilizados en el laboratorio de microbiología**

MATERIAL DE PORCELANA	IMAGEN	UTILIDAD/USO
<b>Mortero</b>		Se emplea para triturar sustancias.
<b>Cápsula</b>		Se utiliza para calentar sustancias y evaporar líquidos.
<b>Embudos Buchner</b>		Se utiliza para la filtración de succión o al vacío. Son generalmente de porcelana.

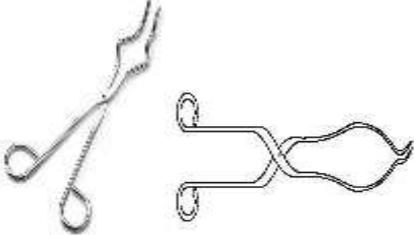
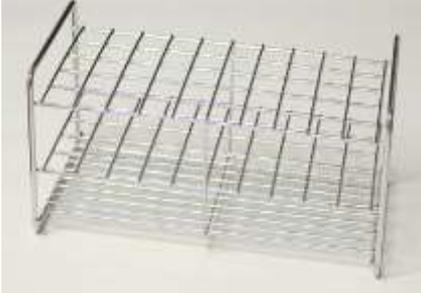
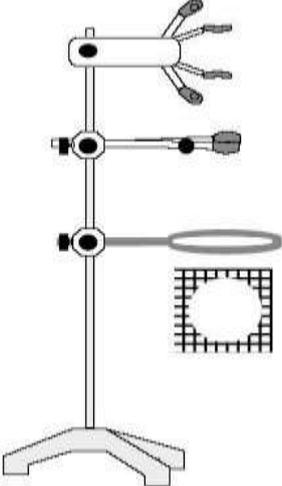
**Tabla 1.3. Material de plástico utilizados en el laboratorio de microbiología**

MATERIAL DE PLASTICO	IMAGEN	UTILIDAD/USO
<p><b>Pipeta Pasteur</b></p>		<p>Instrumento volumétrico de laboratorio que permite medir alícuotas de líquido con bastante precisión. Pueden ser de vidrio o de plástico.</p>
<p><b>Pisetas</b></p>		<p>Es un recipiente cilíndrico sellado con tapa rosca, el cual posee un pequeño tubo con una abertura capaz de entregar agua o cualquier líquido que se encuentre contenido en su interior, en pequeñas cantidades. Normalmente están hechas de plástico.</p>

**Tabla 1.4. Material de goma y madera utilizados en el laboratorio de microbiología**

ELEMENTO	IMAGEN	UTILIDAD/USO
<p><b>Propipeta</b></p>		<p>Accesorios fabricados en goma y especialmente diseñados para asegurar transferencia de líquidos corrosivos, tóxicos u odoríferos.</p>
<p><b>Pinza de madera</b></p>		<p>Se utilizan para colocar y retirar tubos de ensayo que se han de calentar.</p>
<p><b>Hisopos</b></p>		<p>Se utilizan para la siembra de muestras bacterianas en medios de cultivo apropiados. Los cabos pueden ser de madera o plástico. La torunda es de algodón</p>

**Tabla 1.5. Elementos metálicos utilizados en el laboratorio de microbiología**

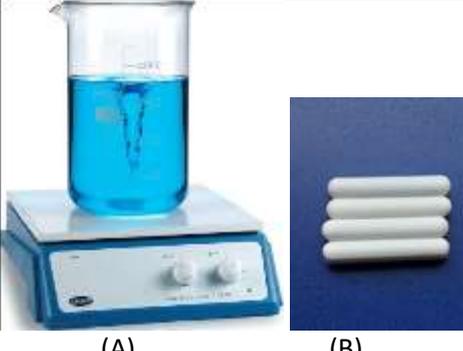
<b>ELEMENTO METALICO</b>	<b>IMAGEN</b>	<b>UTILIDAD/USO</b>
<b>Espátula</b>		<p>Permite tomar sustancias sólidas, para pesar o colocar en otro recipiente. Hay metálicas, plásticas o de porcelana.</p>
<b>Pinza metálica</b>		<p>Se utilizan para colocar y retirar tubos de ensayo que se han de calentar.</p>
<b>Trípode</b>		<p>Se utiliza para sostener materiales que serán calentados sobre el mechero.</p>
<b>Gradilla</b>		<p>Es un utensilio utilizado para dar soporte a los tubos de ensayos o tubos de muestras. Normalmente es utilizado para sostener y almacenar los tubos. Se encuentra hecho de madera, plástico o metal.</p>
<b>Soporte universal</b>		<p>Se utiliza para sostener múltiples aditamentos, tales como pinzas, aros o anillos, entre otros.</p>
<b>Cepillos limpiadores</b>		<p>Permiten la limpieza del material de laboratorio: tubos de ensayo, matraces, balones, entre otros. Hay de distintos tamaños</p>

### 1.3. INSTRUMENTAL Y EQUIPO DE LABORATORIO

En un laboratorio de microbiología, existe una serie de equipos o instrumental necesario, los cuales son auxiliares en la realización de los trabajos de laboratorio.

Entre el instrumental podemos mencionar, termómetros, mecheros de bunsen, agitadores magnéticos y, entre los equipos tenemos Balanzas, pHmetros, estufas de cultivo, baños termostáticos, centrifuga, entre otros. En las Tablas 1.6 y 1.7, se presenta una lista de instrumentos y equipos de laboratorio que se requieren conocer previo al inicio de las actividades prácticas en el laboratorio de la cátedra de Microbiología e Inmunología de la carrera de Licenciatura en Genética.

**Tabla 1.6. Instrumental utilizado en el laboratorio de microbiología**

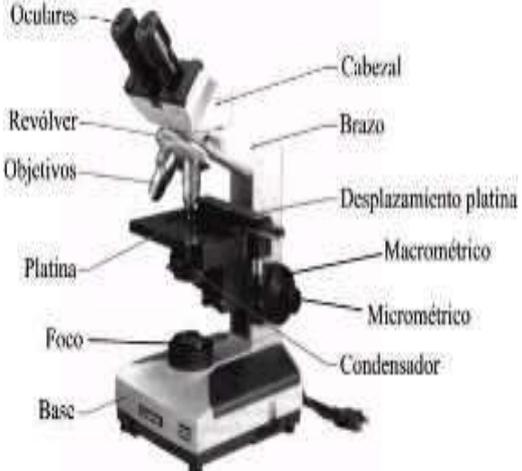
INSTRUMENTAL	IMAGEN	UTILIDAD/USO
<p><b>Termómetro</b></p>		<p>Instrumento utilizado para medir las temperaturas. Están constituidos por un tubo de vidrio capilar cerrado, ensanchado en la parte inferior a modo de pequeño depósito que contiene un líquido (alcohol coloreado o mercurio) que permite medir en una escala los grados de temperatura.</p>
<p><b>Micropipeta automática</b></p>		<p>Constan de un cuerpo calibrado y se utilizan "tips (puntas)" de plástico para recoger el volumen requerido. Existen micropipetas de volumen fijo y de volumen variable. Estas a su vez, se presentan con diferentes rangos de volúmenes. Se utilizan para medir y para trasvasar volúmenes exactos de un recipiente a otro.</p>
<p><b>Agitador magnético</b></p>		<p>Consta de una placa magnética (A) accionada eléctricamente y pequeñas varillas metálicas (B) recubiertas de plástico resistente, las que introducidas en el líquido, son movidas impulsadas por el campo electromagnético de la placa. Se utiliza para ayudar a diluir reactivos sólidos o líquidos.</p>

INSTRUMENTAL	IMAGEN	UTILIDAD/USO
<p><b>Mecheros de Bunsen y de alcohol</b></p>		<p>Es un generador de energía calorífica. Su funcionamiento se basa en que el gas penetra al mechero por un pequeño orificio que se encuentra en la base, y la entrada de aire se regula mediante un aro metálico que también se ubica en la base del mechero.</p> <p>Existen diferentes tipos de mecheros:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- De alcohol: Consta de una botella provista de una mecha, la cual se humedece con el alcohol contenido. Se utiliza específicamente en microbiología, no produce combustión completa.</li> <li>- De Bunsen: Producen llamas ajustables para calentamiento lento o evaporación rápida, asegura una combustión completa. Aplicables a su uso en laboratorios de química y de microbiología</li> </ul>
<p><b>Medios de cultivo</b></p>		<p>Utilizados para cultivar los diferentes tipos de microorganismos. Suministran los nutrientes que los microorganismos necesitan para tal fin.</p>

**Tabla 1.7. Equipos utilizados en el laboratorio de microbiología**

EQUIPO	IMAGEN	UTILIDAD/USO
<p><b>Balanza electrónica</b></p>		<p>Es un instrumento usado en el análisis cuantitativo, para determinar la masa de sólidos y líquidos.</p>

EQUIPO	IMAGEN	UTILIDAD/USO
<p><b>Autoclave</b></p>		<p>Dispositivo que sirve para esterilizar material de laboratorio, utilizando vapor de agua a alta presión y temperatura, como agente esterilizante.</p>
<p><b>Estufa de esterilización</b></p>		<p>Dispositivo que sirve para esterilizar material de laboratorio, utilizando calor seco como agente esterilizante.</p>
<p><b>Estufa de cultivo</b></p>		<p>Utilizada para para mantener un lugar óptimo para el desarrollo y crecimiento de microorganismos.</p>
<p><b>Cámara de anaerobiosis (Gas pack)</b></p>		<p>Cámara utilizada para la incubación de microorganismos anaeróbicos.</p>

EQUIPO	IMAGEN	UTILIDAD/USO
<b>pHchimetro</b>		<p>Mide el potencial eléctrico que producen los iones hidronio en solución, en contacto con una membrana de vidrio, la cual tiene del otro lado una determinada concentración de iones hidronio. El aparato está calibrado de manera tal que pueda leer directamente sobre una escala el valor del pH.</p>
<b>Microscopio óptico</b>		<p>Instrumento óptico destinado a observar de cerca objetos extremadamente diminutos. La combinación de sus lentes produce el efecto de que lo que se mira aparezca con dimensiones extraordinariamente aumentadas, haciéndose perceptible lo que no lo es a simple vista.</p>

Para la observación microscópica óptima es necesario conocer algunos términos:

*Aumento:* El poder de aumento de una lente está determinado por el grado de curvatura de su superficie y la distancia focal. En las lentes convexas mientras mayor sea la curvatura, menor será la distancia focal y mayor será el aumento. Se ha descrito que el microscopio compuesto aumenta en dos etapas y puesto que una sola lente no es suficiente se deben colocar varias lentes una detrás de la otra, potenciando de esta manera el poder de aumento. El primer juego de lentes, cercano al objeto en estudio, se denomina objetivo y el segundo juego, cercano al ojo del observador se denomina ocular. Cada sistema de lentes es capaz de producir una imagen aumentada cuyo valor se enuncia con la letra x, así que 10x significa que la imagen está aumentada 10 veces.

Para conocer en el microscopio compuesto el aumento definitivo de una imagen se aplica la siguiente fórmula:

*Aumento total: Aumento del objetivo x Aumento del ocular.*

Con el microscopio compuesto clásico es posible alcanzar un aumento máximo de 1000x. Esta limitación ha sido resuelta empleando un haz de electrones en lugar de un rayo de luz visible, y se abrió así una nueva era con la microscopía electrónica aplicada al estudio morfológico.

*Resolución:* Es la capacidad que tiene un sistema óptico de aislar dos puntos que se encuentran muy próximos entre sí, de manera que se puedan ver individualizados uno del otro (Figura 1).

La riqueza de detalles que puede ser observada al microscopio depende de la habilidad de este para hacer que los puntos del objeto que están muy cercanos aparezcan en la imagen como puntos separados. Mientras más corta sea la distancia entre esos puntos del objeto, más finos serán los detalles. La distancia entre esos dos puntos se conoce como *Límite de Resolución*, el cual es también referido como el *Poder de Resolución* y puede ser utilizada como un indicador del rendimiento del microscopio. Esto se puede comparar vagamente con algunos aspectos de la informática, el tamaño del pixel por ejemplo; mientras más pequeño sea el tamaño, mayor será la cantidad de detalles de la imagen digital. Límites de Resolución aproximados de algunos sistemas ópticos: - Ojo humano: 0,2 mm. - Microscopio óptico: 0,2  $\mu\text{m}$ . - Microscopio electrónico: 0,2 nm.



Figura 1.1: Resolución de un sistema óptico.

#### **1.4. NORMAS DE TRABAJO Y BIOSEGURIDAD EN LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA**

Con el objeto de cumplimentar el objetivo de visualizar en tiempo y forma los preparados microscópicos y de minimizar accidentes de laboratorio y/o posibles contaminaciones se indican las siguientes precauciones:

- 🚫 No coloque los libros, carteras y ropa sobre las mesadas de laboratorio donde se realizarán los procedimientos microbiológicos.
- 🚫 No sentarse sobre las mesadas de laboratorio.
- 🚫 No apoye sus libros o apuntes al lado de los microscopios, ya que moverá los elementos enfocados y éstos son frecuentemente difíciles de volver a encontrar en el preparado.

- Por la misma razón expuesta en el punto anterior, no recorra el preparado, al menos sin el permiso y/o supervisión del docente.
- No coma, beba, fume, maquille o manipule sus lentes de contacto en el área de trabajo.
- Utilice guantes y guardapolvo cuando maneje los especímenes.
- Si usted tiene cortadas o raspaduras en la piel o en sus manos, cubra éstas con una cinta adhesiva.
- Evite salpicaduras de materia fecal, sangre, cultivos bacterianos, especialmente en la cara, siguiendo las precauciones que le indique su docente.
- Descarte los elementos de laboratorio empleados de la forma y en el lugar que su docente le indique.
- Descontamine la superficie de trabajo al finalizar la actividad o ante cualquier derrame de material potencialmente infeccioso.
- Sáquese los guantes y lávese las manos después de completar cualquier tarea involucrada en el manejo de material biológico. Descarte los guantes en bolsa roja.

Nota: Estas medidas de seguridad deben acatarse aun cuando los especímenes estén fijados o estén en conservadores, puesto que pueden seguir siendo infectantes.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alegría, M.; Bosack, A. (1999) Química I. (pag 308).Editorial Santillana. Buenos Aires.

Condezo, G. (2012). [Materiales e instrumentos de laboratorio - Monografias.com](http://www.monografias.com)  
www.monografias.com

Guía de trabajos prácticos (2017). Catedra Microbiología General. Facultad de Veterinaria. Universidad Nacional del centro de Buenos Aires (UNICEN). Buenos Aires. Argentina.  
[www.vet.unicen.edu.ar](http://www.vet.unicen.edu.ar)

Material de laboratorio [www.quimicaweb.net/ciencia/paginas/laboratorio/material.html](http://www.quimicaweb.net/ciencia/paginas/laboratorio/material.html)

---

*Profesoras responsables, edición 2019: Chade Miriam E., Castrillo M. Lorena, Jerke Gladis*

## **Practica de Laboratorio N° 1**

### **RECONOCIMIENTO DE MATERIAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA**

#### **Consignas**

1. La cátedra dispondrá de Material de Laboratorio diverso en las mesadas del Laboratorio de Practicas de Microbiologia. Cada alumno deberá:
  - Observar y reconocer el material de laboratorio.
  - Observar y reconocer Instrumental y equipos de Laboratorio.
  - Aprender destrezas en la utilización de cada elemento descripto en la presente guía.
  - Adquirir destreza en la clasificación de los elementos del laboratorio de microbiologia

#### **Materiales, instrumental y equipos necesarios**

##### **Materiales**

- Material de vidrio: Matraz, Erlenmeyer, embudos, Kitazato, Vasos de precipitado, Tubos de ensayo, tubos de hemolisis, Probetas, Pipetas graduadas, vidrio de reloj, varilla de vidrio, espátula de Drigalski, placas de Petri, placas de Recuento.
- Material de Porcelana: Mortero, capsula, embudos Buchner.
- Material de Plastico: Pipeta Pasteur, Pissetas, hisopos.
- Material de Goma: Propipeta, mangueras varias
- Material de Madera: Pinzas, hisopos, gradillas
- Material metálico: espátula, pinzas, Tripode, Gradillas, Soporte universal, cepillos.

##### **Instrumental**

- Termometro, Micropipeta, Agitador magnético, Vortex, Mecheros de Bunsen, Medios de Cultivo

##### **Equipos del Laboratorio de Microbiología**

- Balanza electrónica
- Autoclave
- Estufas: de esterilización y de cultivo (Indicar las diferencias)
- Camara de anaerobiosis
- PHchimetro
- Microscopio Optico

## Trabajo Practico N° 2

### BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA.

#### **OBJETIVOS**

- *Definir los conceptos de Bioseguridad, riesgo, agentes, factores y niveles de riesgo*
- *Conocer los 4 Grupos de riesgo definidos en base a la virulencia del agente patógeno*
- *Reconocer los niveles de bioseguridad (BSL) y los elementos requeridos en cada nivel*
- *Manejar los procedimientos de bioseguridad en el laboratorio de microbiología.*
- *Conocer el concepto de áreas biolimpias en laboratorios biológicos*

#### **2.1. INTRODUCCIÓN**

Los laboratorios de microbiología constituyen ambientes de trabajo, a los que debemos prestar especial atención, debido a que pueden presentar riesgo de enfermedades infecciosas para las personas que se encuentren en o cerca de ellos. El trabajo cotidiano en el laboratorio es un trabajo en equipo, en donde la actitud de cada individuo ante las prácticas, así como el entrenamiento que posean en las técnicas requeridas para el manejo de material contaminado, van a determinar su propia seguridad, así como la de sus compañeros y de la colectividad en general.

Todos los procedimientos analíticos, de investigación y docencia utilizados en el laboratorio de Microbiología, entrañan un riesgo a menudo indeterminado. Asimismo, el uso de nuevas técnicas, reactivos químicos, material biológico y equipos (estufas, autoclaves) requiere de conocimientos especiales, instrucción y supervisión adecuadas para evitar accidentes. De igual manera, se entiende que en los laboratorios se desempeña personal de diferentes características culturales y técnicas y, por lo tanto, se debe asumir que no todos poseen los conocimientos de seguridad y bioseguridad necesarios para trabajar en un área determinada. El resultado de un error puede ser perjudicial para el operario, así como para otro personal del laboratorio o para el medio ambiente exterior (Garces, 2008).

Antes de comenzar con las actividades prácticas, todas las personas involucradas (estudiantes y profesores) tenemos la obligación de conocer cuáles son las normas de bioseguridad a seguir en el laboratorio de microbiología, para que las prácticas se realicen con el mínimo riesgo de exposición, tanto para el que lo realiza, como para sus pares y el medio ambiente (Cuadro 1).

#### **Cuadro 2.1. Protección de la bioseguridad.**

¿Para qué prácticas de bioseguridad?
<ul style="list-style-type: none"><li>• Proteger al laboratorista.</li><li>• Proteger a la comunidad.</li><li>• Proteger al medio ambiente.</li></ul>

El termino de Bioseguridad, considerando su etimología proviene de dos vocablos bio (vida) y seguridad (exento de todo peligro), significando en su más pura acepción, “protección de la vida”.

Podemos concebir a la bioseguridad como un conjunto de normas preventivas cuyo objetivo fundamental es proteger la salud de las personas, de la comunidad y el medio ambiente frente a los agentes de riesgos físicos, químicos y biológicos. También podemos concebirla como la identificación de los riesgos y los factores concomitantes en una determinada área de laboratorio para así determinar las medidas preventivas y evitarlos.

La bioseguridad en un laboratorio de microbiología se define como la aplicación en combinación de prácticas y procedimientos de laboratorio, instalaciones edilicias y equipamientos de bioseguridad cuando se trabaja con microorganismos potencialmente infecciosos

En la Norma IRAM 80059, se define como: Conjunto de métodos tendientes a minimizar el riesgo asociado al manipuleo de los microorganismos, mediante la protección de operadores, personas del entorno, animales y el medio ambiente. Involucra técnicas de laboratorio, equipos de seguridad y diseño de las instalaciones.

## **2.2. PRINCIPIOS DE BIOSEGURIDAD**

Bio-seguridad: protección de la vida. Se logra en parte, evitando accidentes.

Prevención: se basa en el conocimiento del peligro y el modo de evitarlo.

Agentes biopeligrosos: lo constituyen todos aquellos agentes biológicos y materiales que son potencialmente peligrosos para los seres humanos, los animales y las plantas. Entre los que podemos citar: bacterias, virus, hongos, parásitos, alergenicos, ácaros, priones, material genético de cualquier origen o sus derivados, como así también tejidos y fluidos de organismos vivos que porten o puedan portar ese material.

Riesgo microbiológico: Se encuentra presente cada vez que se realiza una actividad practica en el laboratorio, en la cual se manipula algún agente biopeligroso que pueda alcanzar concentraciones muy elevadas y pueda llegar a provocar una infección si no son manipulados correctamente, (Garcés, 2008).

Para que tenga lugar un accidente por un agente biopeligroso, deben converger cuatro elementos:

- un huésped susceptible,
- un agente infeccioso,
- una concentración suficiente del agente biopeligroso y
- una ruta de transmisión adecuada.

En el cuadro 2.2, se presentan las vías de contaminación más frecuentes en un laboratorio de microbiología y las maneras en las que pueden ocurrir si no se trabaja con normas de bioseguridad.

**Cuadro 2.2. Situaciones que favorecen la transmisión infecciosa en un laboratorio biológico**

Vía de Infección	Prácticas que favorecen la transmisión
La boca	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ingestión accidental por pipeteo incorrecto</li> <li>• Comer, beber y fumar en el laboratorio.</li> <li>• Realizar transferencias con pipetas sin utilizar ningún tipo de protección.</li> <li>• Transferencia indirecta de microorganismos a través de los dedos o utensilios contaminados (lápices, bolígrafos, etc.).</li> </ul>
La piel	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inoculación accidental con una aguja hipodérmica u otros instrumentos punzantes o de vidrio.</li> <li>• Cortaduras o rasguños.</li> <li>• Salpicaduras de materiales infecciosos.</li> </ul>
Los ojos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transferencia indirecta de microorganismos a través de los dedos contaminados.</li> </ul>
Los pulmones	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhalación de microorganismos transportados por el aire (aerosoles).</li> </ul>

Fuente: Adaptado de Laboratory Safety Manual, University of Texas (2013)

## 2.3. AGENTES DE RIESGO

La OPS define como riesgo, en términos generales, como una probabilidad para que se produzca un daño en un individuo o grupo poblacional en un área geográfica determinada. Esta definición puede aplicarse al riesgo en el trabajo de laboratorio, considerándose como área geográfica las instalaciones propias del laboratorio.

### 2.3.1. Tipos de Agentes de Riesgo

La operación en los laboratorios determina riesgos tanto dentro como fuera de sus instalaciones. El personal de un laboratorio de cualquier naturaleza, está expuesto a los siguientes tipos de riesgo intralaboratorio:

- Infecciones
- Quemaduras
- Intoxicaciones
- Traumatismos
- Explosiones
- Irradiación

Los agentes de riesgo en un laboratorio biológico pueden ser:

- Biológicos: virus, bacterias, clamidias, rickettsias, parásitos u hongos.
- Químicos: ácidos, bases, toxinas: animales o vegetales, etc.
- Físicos: térmico (calor, frío), mecánico (traumas), eléctrico, radiación ionizante, etc

### 2.3.2. Agentes de riesgo biológico

Peligro biológico: Es la propiedad inherente de un agente infeccioso para causar daño en seres humanos, animales o plantas.

Riesgo biológico: es la probabilidad de que, ante la presencia de un determinado peligro, se produzca un daño, pudiendo, por tanto, ser cuantificado

Para estimar el riesgo biológico de deben considerar ciertos factores, descritos en la norma IRAM 80059, listados a continuación del cuadro 2.3, que establecen los criterios de clasificación de los microorganismos infecciosos en cuatro Grupos de riesgo biológico (GRB), presentados en el cuadro 2.3, que resultan en grados de riesgo biológico individual (RBI) y riesgo biológico poblacional (RBP), escaso o nulo, moderado o elevado.

**Cuadro 2.3.** Clasificación de los microorganismos infecciosos por grupos de riesgo

Grupo de Riesgo	Características infecciosas y de virulencia biológicos
<b>GRB 1.</b> (RBI escaso o nulo RBP escaso o nulo)	Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales. <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Sacharomyces</i> , <i>Enterovirus bovino</i>
<b>GRB 2.</b> (RBI moderado, RBP bajo)	Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado. La mayoría de los patógenos conocidos se ubican en este grupo. Bacterias: <i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium sp</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Gardnerella</i> . Hongos: <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Trichophyton spp</i>
<b>GRB 3.</b> (RBI elevado, RBP bajo)	Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces. Bacterias <i>Mycobacterium leprae</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>Brucella abortus</i> , <i>Rickettsia</i> , <i>Salmonella tiphy</i> , Virus : <i>Flaviviridae</i> (Hepatitis C, Fiebre amarilla), <i>Hepadnaviridae</i> (Hepatitis B y D), <i>Herpesviridae</i> ( <i>Virus herpes simple tipo 1 y 2</i> ). Hongos: <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> .
<b>GRB 4</b> (RBI elevado, RBP elevado)	Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces. No hay bacterias, hongos ni parásitos en este grupo. Virus: Familia <i>Arenaviridae</i> : Virus Lassa, Virus Junin, Virus Sabia, Virus Machupo. Familia <i>filoviridae</i> : Virus ebola y virus congo

Fuente: Norma IRAM 80059, Instituto Argentino de Normalizacion

a) virulencia; Grado de patogenicidad de un microorganismo para producir una enfermedad.

b) patogenicidad; Capacidad de un agente infeccioso para causar daño a un hospedador.

c) viabilidad; Habilidad del microorganismo para propagarse.

d) vía de transmisión; Mecanismo de penetración de un microorganismo al hospedador.

e) transmisibilidad; Conjunto de mecanismos que permiten propagar una enfermedad.

f) tipo de actividad; Clasificación de las operaciones que se realizan con los agentes infectantes en los ambientes de trabajo.

g) endemidad. Propiedad de una enfermedad para permanecer en una región determinada.

h) riesgo individual y comunitario;

### **2.3.3. Agentes de riesgo químico**

El personal que trabaja en los laboratorios de microbiología está expuesto no sólo a microorganismos patogénicos, sino también a los peligros que entrañan las sustancias químicas. Es importante que el personal tenga los debidos conocimientos acerca de los efectos tóxicos de esas sustancias químicas, las vías de exposición y los peligros que pueden estar asociados, para saber cómo trasladarlos, almacenarlos, manipularlos y descartarlos. Los fabricantes y/o proveedores de sustancias químicas facilitan hojas informativas con datos sobre la seguridad de los materiales y otras informaciones sobre los peligros químicos. Estas características se encuentran descritas en las etiquetas de los mismos, incluyen: toxicidad, corrosividad, inflamabilidad, radiactividad.

Los accidentes químicos se pueden producir por inhalación (oler directamente del frasco, no usar campana de extracción de gases), por deglución (pipetear con la boca), por contacto (salpicaduras con ácidos, álcalis, sustancias tóxicas y cancerígenas).

Invito al lector, realizar una ampliación acerca del manejo apropiado de sustancias químicas peligrosas, remitiéndolo al Manual de Bioseguridad en el laboratorio, 3ªed, OMS, 2005. Parte VI, capítulo 17 y el Anexo 5 de la misma publicación.

### **2.3.4. Agentes de Riesgo físico**

Está relacionado con los factores ambientales (ruido, iluminación, radiación, temperatura elevada, vibraciones) que puedan actuar sobre tejidos y órganos del operador entrañando un efecto nocivo. Para minimizar este tipo de riesgo, es fundamental conocer bien los materiales con los que se trabaja y tomar las precauciones convenientes.

#### **2.3.4.1. Riesgo eléctrico**

Es indispensable que todas las instalaciones y el equipo eléctricos sean inspeccionados y probados con regularidad, incluida la toma de tierra.

Todo el equipo eléctrico del laboratorio debe ajustarse a las normas y los códigos nacionales de

seguridad eléctrica.

Para evitar el riesgo eléctrico deben tomarse como mínimo, precauciones tales como:

- Conexión a tierra de los equipos, preferiblemente mediante enchufes de tres espigas.
- Transformador de seguridad
- No tocar elementos eléctricos con las manos húmedas
- Evitar las conexiones caseras
- Controlar la integridad de fichas y cables antes de conectarlas a la red eléctrica

#### 2.3.4.2. Riesgo de incendio

El riesgo de incendio, requiere para su ocurrencia que este presente el tetraedro del fuego: Material combustible – oxígeno – Temperatura – reacción en cadena.

Según sea el material incendiado, que arde, el fuego se clasifica en 5 clases:

- A. Cuando arde material sólido
- B. Cuando arde material líquido
- C. Cuando arde material gaseoso
- D. Cuando arden metales
- E. Cuando arde material eléctrico

En el laboratorio se pueden producir los cinco tipos de fuego. En el Manual de Bioseguridad en el laboratorio, 3ªed, OMS, 2005, se realizan las recomendaciones de bioseguridad para riesgos físicos en Parte VI, capítulo 18.

Dependiendo del material incendiado, se deben emplear (o no), diferentes métodos de extinción, Cuadro 2.4.

**Cuadro 2.4.** Tipos y usos de extintores de incendios

TIPO DE EXTINTOR	USO	NO USAR PARA
Agua	Papel, madera, tejidos	Incendios eléctricos, líquidos inflamables, metales incendiados
Gases extintores de CO <sub>2</sub>	Líquidos y gases inflamables, incendios eléctricos	Metales alcalinos, papel
Polvo seco	Líquidos y gases inflamables, metales alcalinos, incendios eléctricos	Equipo e instrumentos reutilizables, pues los residuos son muy difíciles de eliminar
Espuma	Líquidos inflamables	Incendios eléctricos

Fuente: Manual de Bioseguridad en el laboratorio, 3ªed, OMS, 2005

El equipo de lucha contra incendios debe colocarse cerca de las puertas de las salas y en puntos estratégicos de los pasillos y vestíbulos. Los extintores deben ser inspeccionados y mantenidos periódicamente y debe respetarse su vida útil.

## **2.4. FACTORES DE RIESGO EN LOS LABORATORIOS**

Se consideran factores de riesgo las circunstancias ambientales y operativas que están relacionadas con la causalidad de los accidentes que exponen a las personas a los diferentes agentes de enfermedad. Un accidente puede ser el resultado de una causa determinante (ej. dejar caer un frasco de cultivo), aunque con frecuencia hay causas concomitantes que contribuyen directa o indirectamente a ocasionar el accidente o la exposición a agentes de riesgo para el personal de laboratorio (ej. sobrecarga de equipamiento que impide el tránsito libre del personal). La identificación de los posibles factores de riesgo es, sin duda, fundamental para prevenir los accidentes y exposición a infecciones.

### 2.4.1. Instalaciones inadecuadas:

*Distribución de ambientes.* El diseño y distribución de ambientes puede ser incompatible con ciertas actividades. La ventilación e iluminación deficientes son factores de riesgo; pisos y paredes porosas de difícil limpieza, falta de sistemas de eliminación de desechos.

*Distribución y ubicación de los equipos.* La aglomeración de equipos en una sala y la pobre distribución que impide la libre circulación del personal, son factores importantes de riesgo de accidentes en los laboratorios.

2.4.2. Falta de planificación de actividades: esto conduce a la improvisación, a la utilización de métodos inseguros y a la observación de conductas impropias.

2.4.3 Impedimentos físicos humanos: se consideran riesgos para infecciones de laboratorio, las enfermedades crónicas, alérgicas o estados inmunodepresivos, mareos, debilidad o cualquier otro problema de salud que puede disminuir la capacidad física de las personas.

2.4.4. Conocimiento o actitud mental: las faltas de conocimiento, de atención o de concentración sobre una técnica o procedimiento de laboratorio pueden convertirse en riesgos. Se consideran en igual forma, la inhabilidad para trabajar con otras personas, el mal carácter, miedo, excitación o acciones impulsivas o involuntarias.

2.4.5. Elementos ajenos a la organización: se consideran en este grupo: animales silvestres, insectos, vientos, inundaciones, rayos, terremotos, etc.

## **2.5 PUNTOS FOCALES DE RIESGO**

Se consideran como puntos focales de riesgo, aquellos aspectos, sectores o actividades que ofrecen mayores posibilidades para que ocurran accidentes causantes de daño para los laboratoristas y/o para los grupos comunitarios y fauna circundantes. Es precisamente en estos puntos donde deben concentrarse las medidas de seguridad y bioseguridad para reducir los riesgos.

Estos puntos focales van a depender del tipo de laboratorio y tipo de actividad práctica, entre otros. La lista de los puntos focales de riesgo para un laboratorio de Microbiología, destinado a trabajos prácticos de nivel universitario son presentados en el apartado 6: Normas de bioseguridad en los laboratorios de microbiología. Cabe destacar, a modo de resumen, los más relevantes:

Técnicas y prácticas de laboratorio. Se refiere a los siguientes aspectos:

- Producción de aerosoles
- Roturas y derrames
- Uso y manejo de animales de laboratorio
- Falta de manejo de la técnica que perjudica a sí mismo y a los que trabajan en el mismo lugar.

Actitudes del personal

- Hábitos de comer, beber y fumar en el laboratorio.
- Uso de ropas inadecuadas.
- Higiene y orden en el trabajo del laboratorio.
- Ignorancia, falso coraje, imprudencia, autosuficiencia.
- Pereza, temor, miedo, distracciones, irresponsabilidad.
- Malas posturas o hábitos.

Organización y administración

- Acceso no controlado, falta de señalización.
- Acciones de emergencia, personal desprotegido, falta de primeros auxilios.
- Personal no adiestrado.
- Falta de limpieza y orden en el laboratorio.

## **2.6. NIVELES DE BIOSEGURIDAD**

Según la OMS (2006) los laboratorios se clasifican como sigue:

- laboratorio básico – nivel de bioseguridad 1 (BSL1);
- laboratorio básico – nivel de bioseguridad 2 (BSL2);
- laboratorio de contención – nivel de bioseguridad 3 (BSL3);
- Laboratorio de contención máxima – nivel de bioseguridad 4 (BSL4);

Las designaciones del nivel de bioseguridad se basan en una combinación de las características de diseño, construcción, medios de contención, equipo, prácticas y procedimientos de operación necesarios para trabajar con agentes patógenos de los distintos grupos de riesgo. En el cuadro 2 se relacionan, no se equiparan, los grupos de riesgo con el nivel de bioseguridad de los

laboratorios destinados al trabajo con microorganismos de cada uno de esos grupos.

**Cuadro 2.5.** Relación de grupos de riesgo con niveles de bioseguridad, prácticas y equipo

GRUPO DE RIESGO	NIVEL DE BIOSEGURIDAD	TIPO DE LABORATORIO	PRACTICAS DE LABORATORIO	EQUIPO DE SEGURIDAD
1	<b>Nivel 1. Básico.</b>	Enseñanza básica, investigación	TMA	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto
2	<b>Nivel 2. Básico.</b>	Servicios de atención primaria; diagnóstico, Investigación	TMA y ropa protectora; señal de riesgo biológico	Trabajo en mesa al descubierto y CSB clase I, para posibles aerosoles
2, 3	<b>Nivel 3. Contención</b>	Diagnóstico especial, investigación	Prácticas de Nivel 2 más ropa especial, acceso controlado y flujo direccional del aire	Medios de contención primaria adecuadas al nivel. CSB clase II
4	<b>Nivel 4. Contención máxima</b>	Unidades de patógenos peligrosos	Prácticas del nivel 3 mas cámara de entrada con cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos	CSB clase III. Trajes presurizados. Autoclave de doble puerta. Aire filtrado

Nota: TMA: técnicas microbiológicas apropiadas (véase apartado 6). CSB: cámara de seguridad biológica. Fuente: Manual de Bioseguridad en el laboratorio, 3ªed, OMS, 2005

Según la OMS 2006, los países o regiones deberán elaborar una clasificación nacional o regional de los microorganismos en grupos de riesgo, teniendo en cuenta los siguientes factores:

1. La patogenicidad del microorganismo;
2. El modo de transmisión y la gama de huéspedes del microorganismo. Estos dos factores pueden depender de los niveles de inmunidad existentes en la población local, la densidad y los movimientos de la población de huéspedes, la presencia de vectores apropiados y el nivel de higiene ambiental.
3. La disponibilidad local de medidas preventivas eficaces, entre las que cabe citar la profilaxis mediante la administración de antisueros (inmunización pasiva) o vacunas; las medidas de higiene (higiene de los alimentos y del agua, por ejemplo), y la lucha contra los reservorios animales o los artrópodos vectores.
4. La disponibilidad local de tratamientos eficaces, que comprende la inmunización pasiva, la vacunación posexposición y la administración de antimicrobianos, antivíricos y quimioterapia, y debe tener en cuenta la posibilidad de que aparezcan cepas farmacorresistentes.

En Argentina, esta clasificación se encuentra publicada en la Norma IRAM 80059. Algunos patógenos representativos fueron presentados en el cuadro 3.

## 2.7. NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN LOS LABORATORIOS DE MICROBIOLOGÍA

En este apartado se intenta listar las principales normas de bioseguridad a ser tenidas en cuenta cuando se ingresa, trabaja y egresa de un laboratorio de microbiología.

### 2.7.1. Requerimientos generales del laboratorio de Microbiología

- Implementación de un nivel de bioseguridad.
- Prácticas y técnicas de laboratorio acordes al nivel de bioseguridad
- Equipamiento de bioseguridad (barreras primarias): Equipamiento de protección individual (EPI) y Cabinas de Bioseguridad (Anexo I)
- Diseño y construcción de las instalaciones (barreras secundarias): Elementos de diseño y construcción edilicias, entre los que cabe mencionar:
  - Restringir o limitar el acceso cuando se está trabajando (Figura 2.2).
  - Mantener un programa de control de insectos y roedores.



**Figura 2.2.** A) Símbolo internacional de riesgo biológico. B) Frecuentemente presentado dentro de un triángulo amarillo que en señalética indica precaución.

### 2.7.2. Normas de bioseguridad para el laboratorista

#### a) Normas de bioseguridad al Ingreso al laboratorio / indumentaria del laboratorista

- Entrar al laboratorio en forma ordenada, dejar las carteras, libros y otros objetos personales en el lugar que se les indique para tal fin.
- Llevar puesta la bata de laboratorio en todo momento. La misma debe permanecer completamente cerrada.
- Llevar un calzado apropiado, preferiblemente cerrado y de suela antideslizante en las áreas de laboratorio.
- Evitar llevar al laboratorio accesorios que podrían ser fuente de contaminación (por ejemplo joyas, anillos, bufandas).
- Recoger el cabello largo.

### **b) Normas de bioseguridad con relación a las actitudes dentro del laboratorio**

- No comer, beber, fumar, almacenar comida, objetos personales o utensilios, aplicarse cosméticos ni ponerse o quitarse lentes de contacto en ningún área del laboratorio.
- Lavar las manos con agua y jabón antes de realizar las actividades programadas, antes de salir del laboratorio y siempre después de manejar materiales que se sabe o se sospecha que son contaminantes.
- Uso de guantes: quitarse los guantes para revisar el teléfono, abrir heladeras, canillas o puertas, (sumergir manos enguantadas en NaOCl al 10 %).
- Trabajar cerca del mechero, adoptando una buena postura y estando físicamente cómodo. Recordar que la llama de un mechero otorga una zona aséptica de hasta 15 cm.
- Evitar desplazamientos innecesarios, movimientos bruscos. Hablar sólo lo indispensable.
- Conocer el manejo de todos los equipos y reactivos a emplear antes de iniciar las actividades indicadas en la práctica. Si usted tiene alguna duda, diríjase al profesor.
- No se manejarán los autoclaves/estufas o el material recién esterilizado si no se dispone de guantes apropiados

### **c) Normas de bioseguridad en la mesada de trabajo**

- Mantener el área de trabajo ordenada, libre de libros, cuadernos u objetos personales, exceptuando aquellos equipos y materiales necesarios para la realización del trabajo práctico.
- Cada alumno es responsable de la limpieza de su lugar de trabajo y del material asignado, así como de los equipos (estufa, microscopios, balanza) que haya utilizado.
- Limpiar y desinfectar las superficies de trabajo, antes de comenzar y al finalizar la sesión práctica.
- Se deben usar los mecheros bunsen con precaución, no dejando material inflamable cerca y evitando el posible contacto con pelo y ropas.
- No pipetear con la boca: usar propipetas o colocar algodón en las pipetas.
- Evitar salpicaduras y aerosoles.
- No se debe forzar un tubo de vidrio o la apertura de un frasco sin tener protegidas las manos
- Tener cuidado con el alcohol cuando manipule el mechero. Nunca debe dejar éste

desatendido.

- Colocar los materiales de vidrio contaminados en los recipientes dispuestos para tal fin, por ejemplo: las pipetas en los pipeteros, tubos y placas de Petri en la mesada destinada al posterior desecho, etc.
- No usar ningún reactivo que no esté debidamente identificado, verificar las etiquetas de los mismos y estar seguro de cómo emplearlo.
- No devolver sustancias a sus envases originales.
- Emplear la propipeta al medir líquidos. Está rigurosamente prohibido pipetear con la boca. De igual manera las pipetas tendrán tapones de algodón para reducir la contaminación de estos dispositivos de pipeteo.
- Realizar solamente aquellas actividades indicadas por el profesor, no llevar a cabo experimentos no autorizados.
- Reportar inmediatamente cualquier accidente al profesor (derrame de material contaminado, heridas, quemaduras, etc.), ninguno puede ser catalogado como menor.
- Reducir al mínimo la formación de aerosoles durante la realización de cualquier trabajo práctico.
- Extremar las precauciones cuando se utilicen agujas y jeringas para evitar la inoculación accidental y la generación de aerosoles durante su manipulación y desecho.
- Emplear técnicas asépticas para el manejo de cultivos de microorganismos.
- Regresar los reactivos y equipos empleados (microscopio, mechero, etc.), limpios y de manera ordenada a su respectivo lugar una vez finalizada la actividad. Reporte cualquier daño de los mismos al profesor.
- La eliminación de residuos, material desechable y material reciclable se realizará utilizando los contenedores dispuestos para tal fin
- Descartar pipetas utilizadas con material infeccioso en recipientes con lavandina.
- Descontaminar el material de descarte.
- Se comprobará que se ha apagado el gas al finalizar el experimento y antes de abandonar el laboratorio.

## **2.8. EQUIPAMIENTO PRIMARIO DE BIOSEGURIDAD**

### **2.8.1. EQUIPAMIENTO DE PROTECCION INDIVIDUAL (EPI)**

- Protección para el personal del laboratorio: guantes, guardapolvos, anteojos, barbijos, etc.

- Dispositivos para pipeteo.
- Contenedores para desecho de insumos: pipetas, tips, agujas, etc
- Dispositivos de descontaminación del material de descarte: Recipientes para remojo en solución desinfectante, autoclaves, etc

### **2.8.2. CABINAS DE BIOSEGURIDAD**

De acuerdo con el diseño y utilidad de las cabinas de bioseguridad, se conocen tres tipos:

#### Clase I

- El ingreso de aire protege al laboratorista.
- Salida de aire al exterior mediante filtros de HEPA.

#### Clase II

- Protección para el laboratorista, el producto y el medio ambiente.
- Área de trabajo “estéril”.
- Útil en el trabajo con microorganismos que se transmiten vía aerosol.
- Se emplea en cultivos de tejidos y virología.

#### Clase III

- Totalmente aislado, rodeado de un flujo de aire controlado.
- Se emplea para el trabajo con agentes de BSL 3 ó 4.

### **2.9. ÁREAS BIOLIMPIAS**

Un área biolimpia es aquella en la que por una serie de sistemas se lleva la probabilidad estadística de contaminación al mínimo. Los procedimientos que se utilizan son asépticos, en los cuales se trabaja con materiales previamente esterilizados por el método más adecuado para cada uno de ellos.

La mayoría de los contaminantes ambientales son partículas microscópicas que se mantienen en el aire un largo tiempo y que según su tamaño pueden recorrer largas distancias antes de sedimentar. También en cirugía es importante una baja contaminación del área o sala de operaciones, para la prevención de infecciones.

Esto hizo que se diseñaran áreas que reducen la probabilidad de contaminación al mínimo.

Las áreas biolimpias pueden clasificarse en:

1. Áreas biolimpias convencionales: las áreas biolimpias convencionales utilizadas por ejemplo, en la práctica de la medicina y la industria farmacéutica consisten en recintos cerrados, levemente presurizados, provistos de aire filtrado, donde por medios físicos (radiación UV, calor) o químicos se esterilizan superficies, elementos de trabajo y el aire ambiente.

En el local se introduce un gran caudal de aire acondicionado y filtrado por filtros absolutos a

través de grillas difusoras localizadas en paredes, zonas de movimiento turbulento del aire y zonas donde permanece quieto.

Estas áreas tienen los siguientes inconvenientes:

- Al distribuirse el aire en forma turbulenta, las partículas son dispersadas en todas direcciones y se depositan sobre la superficie del área, debiéndose limpiar manualmente. La contaminación se reduce pero llega niveles de 120.000 partículas por pie cúbico.
- La contaminación generada dentro del local no puede eliminarse, por lo que la contaminación aumentará con el tiempo, debiéndose interrumpir el trabajo para efectuar la limpieza.

Debido a que las áreas convencionales no aportan la suficiente seguridad ya que el máximo permitido era 100.000 partículas por pie cúbico, aparecieron, las áreas de flujo laminar, que tuvieron luego su aplicación en medicina e industria farmacéutica.

## 2. Áreas biolimpias de flujo laminar

Corresponden a los gabinetes de seguridad de clases I, II y III. Emplean filtros HEPA (High efficiency particulate air). Presentan las siguientes ventajas:

- Proveen aire limpio sin turbulencia
- Tienen capacidad autolimpiante
- Eliminan la contaminación cruzada (flujo vertical)
- Tienen menores costos de operación en cuanto a trabajos accesorios.

### **2.10. MEDIDAS EN CASO DE EMERGENCIA**

En casos de producirse un accidente o incidente de laboratorio, se recomienda:

- Suspender inmediatamente la tarea que se estaba realizando.
- Avisar al inspector de bioseguridad o docente a cargo.
- Determinar con qué se produjo el accidente y en qué condiciones.
- Buscar atención médica de ser necesario e iniciar un plan de inmunización pasiva-activa.

### **Conducta a seguir en el caso de accidentes más comunes**

A continuación, se mencionan las conductas apropiadas en caso de que ocurran los siguientes accidentes:

1. Aspiración o salpicaduras en la boca: enjuagar inmediatamente con agua.
2. Derrame de material biológico en la mesada:
  - Cubrir con hipoclorito de sodio al 10% concentrado y luego agua.
  - Reportar el incidente al profesor.
3. Derrame de material biológico sobre el cuerpo:

Lavar vigorosamente el área expuesta con agua y jabón por un minuto.

Reportar el incidente al profesor.

La ropa contaminada debe ser colocada en una solución desinfectante antes de ser lavada.

4. Salpicaduras en los ojos con materiales biopeligrosos:

- Lavar inmediatamente el globo ocular e interior de la superficie del párpado con abundante agua durante 15 minutos aproximadamente. Abrir el ojo para asegurar efectivamente el lavado, comenzando por los párpados.
- Reportar el incidente al profesor.

5. Cortadas menores y heridas por pinchazo:

- Lavar vigorosamente la herida con agua y jabón por varios minutos.
- Aplicar un antiséptico adecuado
- Reportar el incidente al profesor.

*Finalmente:*

***La bioseguridad en el laboratorio de Microbiología, es mucho más que una serie de advertencias, es:***

- ***Una forma de trabajo***
  - ***Respeto por los microorganismos y reactivos***
  - ***La responsabilidad con que cada individuo encara su tarea.***

## **Practica de Laboratorio Nº 2**

### **BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA**

#### **Consignas**

La cátedra dispondrá de Elementos de bioseguridad diverso en las mesadas del Laboratorio de Practicas de Microbiología. Cada alumno deberá:

- Observar y reconocer elementos de protección personal (EPI)
- Observar y reconocer elementos de bioseguridad primarios y secundarios
- Conocer elementos de seguridad edilicios del Laboratorio de microbiología
- Adquirir destreza en la clasificación y utilización de los elementos de bioseguridad del laboratorio de microbiología

---

#### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Argentina. Instituto Argentino de Normalizacion (IRAM). Norma IRAM 80059.

Garcés Alessandra. (2008) Normas de Seguridad en el laboratorio de Microbiología. Catedra de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad central de Venezuela.

Lucero N; Coto C. Acata (1992). Manual de bioseguridad para técnicos de laboratorio. Bioquímica Clínica Latinoamericana. Supl Nº2. Buenos Aires, Argentina.

Medvedeff, M.G., Bargardi, S, Jerke, G; Horianski, M.A.; Amer, L. (2006) Guía de Trabajos Prácticos. Catedra de Microbiología e Inmunología. 1° Parte. Editorial Universitaria de UNaM. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones.

Organización Mundial de la Salud. (2006) Manual de bioseguridad en el laboratorio. Ginebra.

United States. Department of Labor. (2011) Laboratory Safety Guidance Occupational Safety and Health Administration. Occupational Safety and Health Administration OSHA 3404-11R.

[www.osha.gov](http://www.osha.gov)

University of Iowa (2017). ENVIRONMENTAL HEALTH AND SAFETY  
<https://ehs.research.uiowa.edu/>

University of Texas at Austin (2013). Laboratory Safety Manual. ENVIRONMENTAL HEALTH AND SAFETY Texas. EEUU. <https://ehs.utexas.edu/programs/labsafety/documents/Lab-Safety-Manual.pdf>

---

*Profesora responsable, 1º edición 2006 y 2º edición 2019: Dra Jerke Gladis*

**Trabajo Practico N° 3**  
**TOMA DE MUESTRAS**  
**EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO**  
**RECONOCIMIENTO DE ESTRUCTURAS MICROBIANAS**

**OBJETIVOS**

- *Valorar la importancia de la muestra para un correcto examen microbiológico.*
- *Valorar la utilidad del microscopio en el análisis microbiológico.*
- *Conocer técnicas de análisis microscópicos en fresco.*
- *Observar y reconocer estructuras en un examen en fresco empleando diferentes técnicas.*

### **3.1. INTRODUCCIÓN**

Las muestras que se reciben en un laboratorio de microbiología para su análisis pueden ser muy variadas. Estas comprenden muestras de alimentos, materiales clínicos, materiales de origen vegetal, líquidos de diversos orígenes, objetos, partes de equipos, etc. El responsable del laboratorio deberá considerar la naturaleza de la muestra y posible contenido del espécimen, y conocer las dificultades para el cultivo y la tinción de ciertos microorganismos.

### **3.2. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA**

La correcta recolección y transporte de una muestra para su estudio microbiológico es, posiblemente, la etapa más importante para lograr el aislamiento de microorganismos responsables de procesos, de contaminaciones y/o de infecciones.

Una muestra incorrectamente recogida puede causar un fracaso en el aislamiento del agente etiológico. La recuperación de gérmenes contaminantes no asociados a un proceso puede conducir a un diagnóstico microbiológico equivocado y, en consecuencia, a la instalación de una terapia o a la toma de medidas inadecuadas, que de acuerdo al caso pueden agravar el cuadro clínico del paciente, poner en riesgo la salud de la población, ocasionar pérdidas económicas importantes o mala utilización de recursos.

#### **3.2.1. Normas básicas para la recolección de muestras**

1. Elegir el material que refleje con mayor posibilidad el verdadero proceso, contaminación y/o infección. La recogida de la muestra deberá realizarse en condiciones de máxima asepsia, evitando contaminaciones ambientales, del personal y del propio enfermo, a la muestra y viceversa.

2. Establecer períodos óptimos para la recolección de muestras, a fin de tener la mejor oportunidad de aislar los microorganismos causales.
3. Obtener suficiente volumen de muestra para llevar a cabo las distintas técnicas de estudio.
4. Utilizar dispositivos de recolección, recipientes para las muestras y medios de cultivo adecuados para asegurar el óptimo aislamiento de microorganismos.
5. Obtener las muestras, siempre que sea posible, antes de administrar o agregar antimicrobianos.
6. Recolectar las muestras con dispositivos o en envases estériles los que deben estar correctamente rotulados.
7. Utilizar medios de transporte adecuados, en caso necesario.
8. Remitir a la brevedad la muestra al laboratorio para su estudio microbiológico.

### **3.2.2. Transporte de la muestra**

El principal objetivo del transporte de una muestra es la preservación del material, lo más semejante a su estado original, con un mínimo de deterioro y sin riesgos de contaminación para quien manipula estas muestras.

El envío al laboratorio de microbiología debe ser lo más rápido posible con el objeto de asegurar la supervivencia de los microorganismos y de evitar el sobrecrecimiento de la microbiota habitual.

Se recomienda un máximo de 2 horas entre la recolección y el envío al laboratorio. Durante el transporte se debe evitar condiciones ambientales extremas: temperaturas altas o bajas, cambios de presión y desecación.

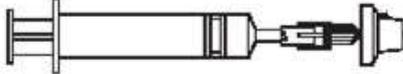
Para la recolección y transporte de muestras se pueden emplear diversos dispositivos como los que se indican en las Tablas 3.1 y 3.2.

**Tabla 3.1.** Dispositivos de recolección y transporte de muestras para la investigación de microorganismos aerobios.

Dispositivos de recolección y transporte	Utilidad
Hisopos en tubos con medio de transporte 	Mantienen un pH favorable y previenen la desecación de la muestra.
Hisopos de alginato cálcico	Investigación de <i>Chlamydia</i> spp. y <i>Bordetella</i> spp. Pueden ser tóxicas para <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>U. urealyticum</i> y virus.
Hisopos de dacrón	Útiles para la investigación de virus.
Hisopos de algodón	Pueden inhibir a <i>Chlamydia</i> spp. Cuando el hisopo es de madera, puede inactivar a virus del grupo Herpes e interferir con las pruebas de identificación de <i>Ureaplasma</i> .
Hisopos para exudados nasofaríngeos	Hisopos flexibles que emplean alambre en lugar de varilla de madera.
Tubos o frascos estériles de boca ancha 	Transporte de orinas, esputos, lavados broncoalveolares, heces, biopsias, alimentos, agua, etc.
Tubos estériles	Muestras líquidas, aspirados de abscesos y de heridas.
Tubos estériles con medio de transporte o conservante	Tubo estéril con medio de transporte (Cary Blair) para enteropatógenos en heces. Tubo con fijador (alcohol polivinílico) para parásitos en heces. Tubo con conservante (ácido bórico-formiato de sodio) para orinas. Mantiene la población bacteriana durante 48 h a temperatura ambiente sin necesidad de refrigeración.
Placas de Petri estériles	Útiles para pelos, escamas cutáneas y uñas.
Bolsas estériles 	Muestras sólidas y líquidas.

**Fuente:**  
Adaptado de Guerrero Gómez y Sánchez Carriello, 2003

**Tabla 2.2.** Dispositivos de recolección y transporte de muestras para la investigación de microorganismos anaerobios.

Dispositivos de recolección y transporte	Utilidad
<p>Hisopos con sistemas de transporte específicos para anaerobios o viales y tubos con atmósfera anaerobia.</p> 	<p>Contienen un medio de transporte semisólido con un agente reductor y un indicador (azul de metileno). Cualquier coloración azul de medio indica exposición al aire.</p>
<p>Bolsas de anaerobiosis</p>	<p>La muestra se introduce en el interior de una bolsa impermeable en cuyo interior se introduce un catalizador y un generador de hidrógeno y CO<sub>2</sub>.</p>
<p>Jeringa para la obtención de aspirados</p> 	<p>Cuando no se dispone de ninguno de los sistemas anteriores o bien la cantidad de muestra es mínima, puede utilizarse la misma jeringa con la que se ha obtenido. Para ello hay que eliminar el aire y taponar la aguja con un tapón de goma.</p>

**Fuente:** Adaptado de Guerrero Gómez. y Sánchez Carrillo, 2003.

- Las muestras para estudio de microorganismos anaerobios no deben ser refrigeradas
- Los frascos para recolección y transporte de líquidos deben tener tapa de rosca; no se deben usar tapones de gasa o de algodón porque pueden absorber el líquido colectado y generar el riesgo de derramamiento y exposición biológica.
- Las muestras no deben rebasar los límites sugeridos en cada uno de los diferentes contenedores, ya que ello puede interferir con el crecimiento adecuado de microorganismos y puede ser riesgoso para quien lo transporta o lo manipula en el laboratorio.
- El personal que transporta las muestras al laboratorio debe de transportarlas de forma segura, por lo que se debe utilizar guantes, ya que en algunas ocasiones la parte externa del contenedor pudo haber tenido contacto con la muestra y ser una fuente de infección.

### 3.2.3. Recepción y procesamiento de las muestras en el laboratorio de microbiología

La recepción de la muestra se realizará en el área del laboratorio destinado a tal fin. El personal debe estar en conocimiento de los criterios de rechazo establecido por el laboratorio. Este utilizará la indumentaria de protección adecuada para evitar el peligro de sufrir una infección adquirida.

Una vez que la muestra se recibe en el laboratorio de microbiología, los primeros pasos en el manejo de la misma incluyen:

- **Registro de los datos**
- **Evaluación de aceptación o rechazo**

- **Examen macroscópico**
- **Examen microscópico**

**Registro de los datos:** Se debe registrar el nombre del paciente, el servicio o empresa solicitante, nombre del responsable que solicita (jefe de área, médico, etc.), teléfono de contacto, el tipo de muestra, la fecha y la hora de recogida. Otros datos de interés son historia clínica y diagnóstico del paciente, uso de antibióticos, etc.

**Evaluación de aceptación o rechazo:** Consiste básicamente en determinar si la muestra cumple o no con los requisitos de calidad necesarios para ser procesada. Estos requisitos incluyen: la correcta identificación de la muestra, el uso de recipientes apropiados, la valoración de la cantidad suficiente para el estudio solicitado y la comprobación de las condiciones y tiempo adecuados de transporte y conservación. Si no cumple con estos requisitos se debe solicitar una segunda toma de muestra siempre que sea posible.

**Examen macroscópico:** Consiste en la observación directa de las características de la muestra. El examen macroscópico ofrece inmediata información, imposible de lograr de ningún otro modo. Este puede proveer características valiosas en cuanto a la naturaleza y calidad de la muestra recogida.

Se debe registrar: cantidad, olor, color, aspecto, pus, sangre, moco, parásitos, presencia de gas, gránulos, sedimento, etc.

**Examen microscópico:** La importancia del examen microscópico de las muestras es que, no solo puede convalidar la calidad de las mismas, sino que la observación de distintos tipos de células, bacterias, micelios, levaduras, estructuras parasitarias, cristales, polvos, granos de almidón, glóbulos de grasas, etc. pueden proveer información suficiente para formular un diagnóstico microbiológico presuntivo. El examen microscópico directo puede también proporcionar evidencia sobre la presencia de especies bacterianas anaerobias.

El examen microscopio de las muestras, tanto los aislados microbianos o los microorganismos de ciertos materiales clínicos se puede realizar de dos maneras: en estado *in vivo* y por fijación.

- Estado *in vivo*: Consiste en observar directamente, la muestra o suspensión microbiana depositada en un portaobjetos, al microscopio. Este tipo de examen permite visualizar microorganismos vivos y reconocer sus movimientos, apreciar sus distintas formas, tamaños y agrupaciones. Será abordado en la presente práctica de laboratorio.

- Por fijación: La muestra se fija al portaobjetos, lo que se denomina extendido o frotis, y se colorea antes de su observación al microscopio. Este examen posibilita, según la técnica utilizada, diferenciar microorganismos, observar su morfología, tamaño y agrupación o la observación de ciertos elementos facultativos como flagelos, capsula ó endosporas. Sera realizado en la siguiente practica de laboratorio microbiológico.

### **3.3. EXAMEN EN FRESCO *IN VIVO***

Muchas veces es necesario examinar algunos microorganismos en estado *in vivo*, porque no se los pueden colorear convenientemente ni se los pueden cultivar con facilidad. También, al examinarlos *in vivo*, no se altera su morfología y es posible observar su movilidad y otras características.

Las muestras pueden ser extendidas directamente sobre la superficie de un portaobjetos o, si el material es espeso, puede diluirse con solución fisiológica estéril para facilitar la diferenciación de los distintos elementos.

Se coloca un cubre objetos sobre la superficie del material, y se seca con papel absorbente el exceso de líquido que escapa por los bordes. Este tipo de preparación se conoce como montaje directo o montaje en fresco. Para observaciones posteriores se lo puede conservar, sellando los bordes con esmalte de uñas o con mezcla de parafina-vaselina (Vaspar).

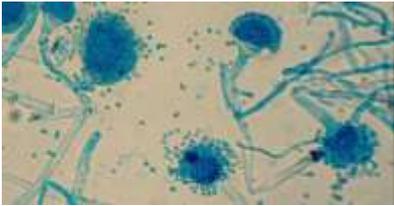
Este tipo de preparaciones y otras con algunas modificaciones se observan con microscopio de campo claro o de contraste de fase.

Las preparaciones húmedas con frecuencia se emplean para detectar: huevos, quistes, trofozoítos móviles de parásitos, células de distintos tipos, elementos fúngicos, etc.

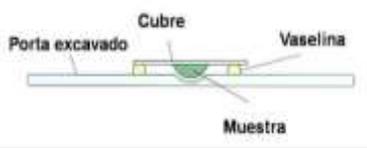
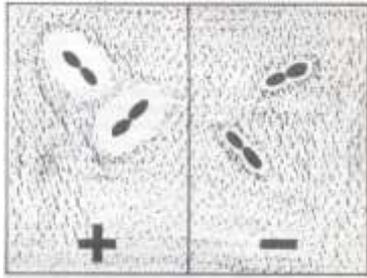
En el Tabla 3.3 se detallan distintas técnicas utilizadas para el examen directo de muestras sin teñir.

**Tabla 3.3.** Técnicas de examen directo de muestras sin teñir.

Métodos y materiales	Propósito	Técnicas
<p><b>Montaje en solución salina</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. CINA acuoso 0,85%</li> <li>2. Portaobjetos</li> <li>3. Cubreobjetos</li> </ol> <p>Esmalte de uñas o Vaspar</p>	<p>Determinar actividad biológica de microorganismos, incluyendo movilidad. Ej. Huevos, quistes, larvas, trofozoítos móviles de parásitos, elementos fúngicos, células.</p> 	<p>- Sobre un portaobjetos suspender en una gota de solución fisiológica una pequeña cantidad de muestra.</p> <p>Colocar un cubreobjetos y examinar al microscopio con objetivo de 10x y 40x. Bajando el condensador para reducir la cantidad de luz transmitida.</p> <p>Sellar el cubreobjetos con vaspar.</p>
<p><b>Montaje en lodo</b></p> <p>Solución de Lugol*</p> <p>Portaobjetos</p> <p>Cubreobjetos</p> <p>Esmalte de uñas o Vaspar</p> <p>*lodo 5 g KI 10 g Agua 100 mL</p> <p>Disolver el KI y añadir el lodo hasta disolución. Filtrar y conservar en frasco con tapa hermética. Diluir 1:5 con agua antes de usar.</p>	<p>Se emplea habitualmente en paralelo con el montaje en solución fisiológica al examinar heces u otros materiales para detectar protozoos intestinales o huevos de helmintos.</p> <p>El lodo tiñe núcleos y organelas intracitoplasmáticas de modo que se visualizan con más facilidad.</p> <p>No se puede usar en reemplazo del montaje en solución fisiológica, pues el lodo paraliza la movilidad de bacterias y trofozoítos.</p>	<p>Suspender sobre un portaobjetos en una gota de solución de lugol, una pequeña cantidad de materia fecal u otro material. Mezclar, colocar un cubreobjetos y examinar al microscopio.</p> <p>En caso que se deba demorar la observación o se desee un preparado semipermanente para futuros estudios, sellar los bordes.</p> 
<p><b>Montaje en hidróxido de potasio</b></p> <p>KOH 10% acuoso</p> <p>Portaobjetos</p> <p>Cubreobjetos</p> <p>Esmalte de uñas o Vaspar</p>	<p>Ayuda a detectar elementos fúngicos en muestras que contienen queratina (piel, pelo, uña).</p> <p>El KOH disuelve la queratina de fondo desenmascarando los elementos fúngicos hasta hacerlos más visibles.</p> 	<p>Suspender en una gota de KOH al 10% escamas de piel, pelos o uñas.</p> <p>Colocar un cubreobjetos y dejar asentar a temperatura ambiente aproximadamente 30 min. El preparado se puede calentar suavemente en la llama de un mechero para acelerar el proceso de aclaramiento. No dejar hervir.</p> <p>Examinar al microscopio para detectar hifas o esporas.</p>
<p><b>Métodos y materiales</b></p>	<p><b>Propósito</b></p>	<p><b>Técnicas</b></p>

<p><b>Montaje en lactofenol azul algodón</b></p> <p>Acido láctico Azul algodón Glicerina Fenol Agua destilada Portaobjetos Cinta adhesiva transparente</p>	<p>Conserva las características de agrupamiento de las esporas de los hongos. El azul algodón tiñe la quitina de las paredes fúngicas, el fenol destruye a la flora acompañante y el ácido láctico conserva las estructuras fúngicas.</p> 	<p>Colocar una gota de azul de lactofenol sobre el portaobjetos. Adherir una porción de cinta adhesiva transparente sobre la colonia fúngica para tomar una porción del micelio aéreo. Pegar un extremo de la cinta adhesiva cargada con el micelio en el extremo del portaobjetos. Presionar la cinta sobre el colorante para permitir que el micelio se empape en la solución y pegar el extremo de la cinta adhesiva al portaobjetos. Observar al microscopio</p> 
<p><b>Técnica de la tinta china</b></p> <p>Tinta china o nigrosina Portaobjetos Cubreobjetos</p>	<p>Observación microscópica directa de cápsulas de varios microorganismos. La tinta china da un fondo semiopaco contra el cual se pueden ver fácilmente las cápsulas claras. Ej. Cápsula de <i>Cryptococcus neoformans</i> en líquido cefalorraquídeo (LCR) u otras secreciones.</p> 	<p>Centrifugar ligeramente el LCR u otra muestra líquida, para concentrar los microorganismos en el sedimento. Emulsionar sobre un portaobjeto una pequeña cantidad de sedimento en una gota de tinta china y colocar un cubreobjetos. La emulsión de contraste no debe ser muy espesa, ya que puede bloquear totalmente la luz transmitida. Evaluar al microscopio con objetivo de 10x para "screening" y con 40x para confirmar la presencia de microorganismos capsulados sospechosos.</p>
<p><b>Examen en campo oscuro</b></p> <p>Microscopio compuesto, equipado con condensador de campo oscuro Portaobjetos Cubreobjetos Solución fisiológica Esmalte de uñas o Vaspar</p>	<p>Visualizar microorganismos delicados, que son invisibles en campo brillante y se tiñen con dificultad.</p>  <p>Especialmente útil para detectar <b>espiroquetas</b> en materiales biológicos, sobre todo en orina con sospecha de contener <i>Leptospiras</i> o en chancros sifilíticos en los que se sospecha la presencia de <i>Treponema</i></p>	<p>Es una técnica de contraste donde solo la luz difractada desde el espécimen se usa para formar la imagen. El espécimen aparece brillante contra un fondo oscuro. Se recoge una pequeña porción del material sobre un portaobjetos. Colocar un cubreobjetos. Examinar directamente con un microscopio provisto de condensador de campo oscuro con objetivo de 40x o 100x. Las espiroquetas aparecen como "tirabuzones" móviles y brillantes contra un fondo negro.</p>

	<i>pallidum.</i>	
<b>Reacción de Neufeld “quellung”</b>  Suero anticapsular homólogo  Solución fisiológica  Portaobjetos  Cubreobjetos	Cuando las bacterias capsuladas se ponen en contacto con un suero que contiene anticuerpo anticapsular homólogo, sus cápsulas sufren un hinchamiento visible al microscopio. Esta técnica serológica es útil para identificar <i>Streptococcus pneumoniae</i> en líquidos biológicos o cultivos.	Extender el volumen de un ansa del material sobre un área de 1 cm en ambos extremos de un portaobjetos. Dejar secar y extender sobre una de las áreas un ansa de suero tipificador anticapsular específico y sobre la otra un ansa de solución salina como control. Colocar sendos cubreobjetos y examinar al microscopio con objetivo de 100x de inmersión con aceite. Los organismos que exhiben una reacción positiva aparecen rodeados de un halo refringente y traslúcido producido por la opacificación capsular. Comparar con el control de solución salina, donde no debe observarse hinchamiento de cápsulas.
<b>Técnica de la gota pendiente</b>  Portaobjeto de gota pendiente*  Cubreobjetos  Solución fisiológica  Esmalte de uñas / Vaspar  *Portaobjetos de vidrio grueso, con concavidad central.	Persigue el mismo propósito que el montaje con solución fisiológica, salvo que hay menor distorsión por el peso del cubreobjetos y se puede lograr un campo de foco más profundo dentro de la gota. Se usa generalmente para estudiar movilidad de bacterias.	Colocar una pequeña cantidad de Vaspar alrededor del borde de la concavidad de la superficie superior de un portaobjetos de gota pendiente. En el centro del cubreobjetos, suspender las células de la colonia bacteriana en examen en una gota de agua o solución salina. Invertir el portaobjetos y presionarlo sobre el cubreobjetos, guiando la gota de suspensión bacteriana hacia el centro de la concavidad. Volver cuidadosamente el portaobjetos a la posición normal para realizar el examen microscópico directo.



Fuente: Adaptado de Winn y col., 2008.

**Practica de Laboratorio N° 3**  
**TOMA DE MUESTRAS**  
**EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO**  
**RECONOCIMIENTO DE ESTRUCTURAS MICROBIANAS**

**Consignas**

2. Se dispondrá de preparados realizados por la cátedra con las diferentes técnicas de montaje. Cada alumno deberá:
  - Observar y reconocer las estructuras al microscopio óptico.
  - Esquematizar en cada caso las observaciones microscópicas realizadas.
  - Indicar el aumento del objetivo con el que realiza la observación (10x; 40x, etc.).
  - Jerarquizar las medidas relativas de los distintos elementos visualizados en el campo microscópico.
  
2. Se dispondrá de distintas muestras para realizar la observación y descripción macroscópica. Cada alumno deberá:
  - Registrar datos tales como cantidad, olor, color, aspecto, consistencia, presencia de gas, gránulos, sedimento macroscópico, pH, etc.
  - Realizar las distintas técnicas de examen microscópico directo, según la Tabla 3.3.  
Montaje en: solución fisiológica, Iodo, hidróxido de potasio, tinta china, lactofenol azul de algodón.

**Materiales y reactivos necesarios**

- Mechero de Bunsen
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Ansas
- Algodón
- Etanol
- Solución fisiológica
- Solución de Lugol
- Solución de Lactofenol azul algodón
- Solución de KOH al 10%
- Tinta china

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bernis Mateu J. (1995). *Atlas de microscopia*. Ediciones Jover.
- Forbes, B. A., Sahm, D. y Weissfeld A. (2009). *Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico*. 12<sup>o</sup> Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- Gardner P. y Provine H.T. (1979). *Manual de infecciones agudas bacterianas: Diagnóstico precoz y tratamiento*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- Guerrero Gómez C. y Sánchez Carrillo C. (2003) *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2003. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>
- Madigan M.T., Martinko J. M., Bender K. S., Buckley D. H., Stahl D. A. (2015) *Brock. Biología de los microorganismos*. 14<sup>a</sup> Edición. Editorial Pearson. Madrid, España.
- Medvedeff, M.G., Bargardi, S, Jerke, G; Horianski, M.A.; Amer, L. (2006) *Guía de Trabajos Prácticos*. Catedra de Microbiología e Inmunología. 1<sup>o</sup> Parte. Editorial Universitaria de UNaM. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones.
- Velasco J. Araque M. del C, Araujo E., Longa A., Nieves B., Ramírez A. C., Sánchez K., Velasco E. (2008). *Manual práctico de bacteriología clínica*. Libros de Publicaciones de Vicerrectorado Académico ULA. Universidad de Los Andes, Venezuela.
- Winn W. C., Allen S. D., Janda W. M., Koneman E. W., Procop G. W., Schrenckenberger P. C. y Woods G. L. (2008). *Koneman. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas en color*. Edición 6<sup>a</sup>. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.

---

*Profesores responsables, 1<sup>o</sup> edición 2006: Dra Medvedeff Marta G., Dra Jerke Gladis*

*Profesora responsable, 2<sup>o</sup> edición 2019: Dra Horianski Marta A.*



**Trabajo Practico N° 4**  
**MÉTODOS PARA EL EXAMEN DE LAS MUESTRAS**  
**TÉCNICAS DE COLORACIÓN MICROBIOLÓGICAS**

**OBJETIVOS**

- *Reconocer las distintas metodologías utilizadas para obtener contraste entre la célula y el medio que la rodea, a fin de poder ser visualizada microscópicamente.*
- *Adquirir destreza en el montaje y observación de preparados microbiológicos empleando técnicas de tinción simple y diferencial.*
- *Conocer las principales técnicas de coloración empleadas en el diagnostico microbiológico: C. de Gram, C. de Ziehl Neelsen, C de May Grünwald Giemsa.*
- *Reconocer la finalidad y campo de aplicación de cada técnica de coloración.*
- *Comprender la fundamentación química, basada en la morfología microbiana, de cada técnica de coloración microbiológica.*

#### **4.1. PRINCIPIOS GENERALES DE LAS COLORACIONES**

En microbiología el microscopio se utiliza de forma rutinaria, ya que proporciona importante información para la identificación temprana y definitiva de los microorganismos. Para aprovechar esta ventaja de los microscopios, se han desarrollado técnicas tintoriales que destacan las características morfológicas de los microorganismos. Existe una gran variedad de tinciones que pueden ser aplicadas dentro del campo de la microbiología. Por lo general, los microorganismos son transparentes, y ello dificulta el estudio de los detalles morfológicos cuando se los examina en su estado natural. Los primitivos métodos de fijación y coloración fueron iniciados por Paul Erlich y Robert Koch.

Existen técnicas de tinción específicas de gran utilidad, como la tinción de Ziehl-Neelsen, que se utiliza para el diagnóstico de enfermedades crónicas como la tuberculosis o la actinomicosis, o la tinción de azul de lactofenol, que preserva e identifica a los componentes estructurales de los hongos. Las diferentes tinciones en el laboratorio microbiológico tienen una utilidad fundamental para el diagnóstico y tratamiento oportuno de múltiples patologías de etiología infecciosa.

Un colorante se define como una sustancia capaz de dar color a células, tejidos, fibras, etcétera. De acuerdo con su origen, se pueden dividir en: colorantes naturales, los cuales son extraídos de plantas o animales, y colorantes artificiales, que son aquellos de minerales procesados y manipulados en el laboratorio.

Químicamente, el colorante está constituido de un componente auxócromo. y un cromóforo. Los auxocromos son grupos positivos de átomos, que intensifican la acción de un grupo de átomos no saturados (cromóforos) que, estando presentes en una molécula de una sustancia

química, hacen que esta sea coloreada. Muchos de estos grupos o radicales, son ácidos y bases que originan colorantes ácidos y básicos, y que fijan eficazmente el colorante.

Los colorantes utilizados en microbiología son sales, las cuales tienen un ion cargado positivamente y otro negativamente, de los cuales uno está coloreado (auxocromo). Cuando el ion coloreado es el cargado negativamente, el colorante se clasifica como aniónico o ácido, por ejemplo, el eosinato de sodio, el cual se ioniza como sodio<sup>+</sup> y eosinato<sup>-</sup>. Cuando el ión coloreado es el cargado positivamente, el colorante se clasifica como catiónico o básico, por ejemplo el azul de metileno, el cual se ioniza como cloruro<sup>-</sup> y azul de metileno<sup>+</sup>

Algunos ejemplos de auxocromos son:

- Ácidos: -COOH, -OH, -SO<sub>3</sub>H. Ácido (-) se combinan con Proteínas (+). Ej: eosina, Fucsina ácida, Rojo congo.
- Básicos: -NHR, -NR<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>. Básico (+) se combinan con Ácidos nucleicos Poliacáridos ácidos. Ej: Azul de metileno, Cristal violeta, Safranina.

Al poner en contacto una célula bacteriana con un colorante ocurre un intercambio de iones entre el colorante y los sitios activos de las superficies o el interior de la célula. Los iones teñidos del colorante reemplazan a los iones de los componentes celulares, así, por ejemplo, el catión azul de metileno<sup>+</sup> reemplaza al catión Na<sup>+</sup> de las células dándoles color.

Aunque los microorganismos vivos se pueden observar directamente en fresco al microscopio óptico, la mayoría de las veces es necesario teñirlos para que, por medio del uso de colorantes, sea mucho más fácil su identificación mediante la visualización coloreada de ciertas estructuras, así como su reacción a determinadas técnicas.

Los colorantes tienen las siguientes funciones:

1. Permiten hacer visibles a los objetos microscópicos y transparentes.
2. Revelan su forma y tamaño
3. Muestran la presencia de estructuras internas (en algunos casos) y externas.
4. Producen reacciones químicas específicas, revelando la composición química de la pared celular y estructuras específicas.

Se aconseja utilizar cultivos jóvenes para los métodos de coloración de rutina. Las células viejas pierden su afinidad para la mayoría de los colorantes. En general los mejores resultados se obtienen en cultivos de 24 h para bacterias y levaduras, mientras que para hongos filamentosos se requieren cultivos de 5 a 7 días.

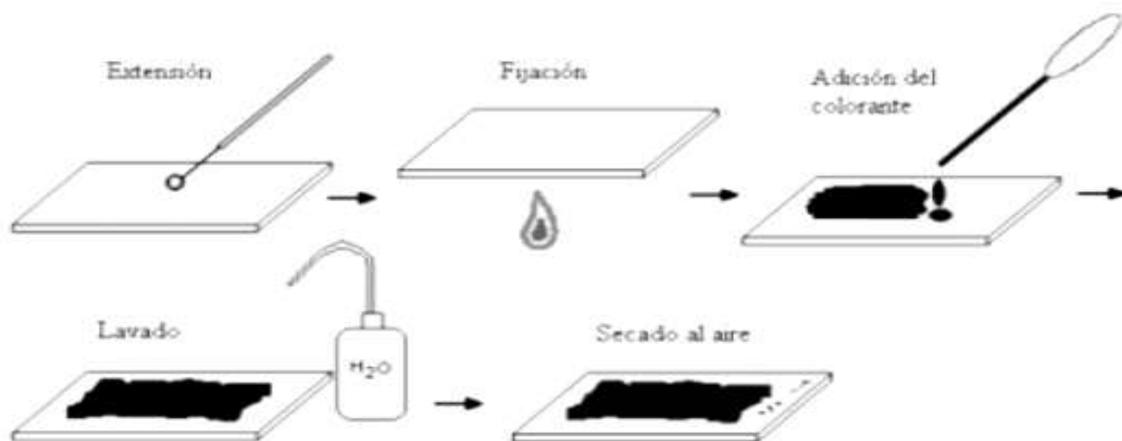
## **4.2. CLASIFICACION DE COLORACIONES MICROBIOLÓGICAS**

Según la estructura que el colorante tiñe en la bacteria, las coloraciones se han clasificado en:

- **COLORACIONES SIMPLES:** toda la muestra se tiñe del mismo color y se utiliza un sólo colorante para el proceso. Ejemplos: Azul de metileno, Fucsina fenicada, Verde de malaquita.
- **COLORACIONES COMPUESTAS Y DIFERENCIALES:** se visualiza más de un color porque se utiliza más de un colorante dentro del procedimiento de tinción. Ejemplos: Gram, Ziehl Neelsen y May Grünwald -Giemsa
- **COLORACIONES ESTRUCTURALES:** Consisten en el empleo de técnicas y colorantes específicos con la finalidad de poner de manifiesto, algunas estructuras especiales típicas microbianas, tal es el caso de:
  - a) Flagelos Rhodes, Tribondeau, Gray
  - b) Esporas: Shaeffer-fulton, Dorner
  - c) Cápsula: Hiss, Tinta china, Muir o Anthony,
  - d) Gránulos metacromáticos: Ernst-Neisser, Albert, Loeffler

#### 4.3. PASOS GENERALES EN LAS COLORACIONES

La tinción o coloración es un método sencillo para incrementar el contraste entre la célula y su entorno y por lo tanto contribuye a mejorar la imagen observada. En Microbiología todas las tinciones se realizan a partir de suspensiones de microorganismos extendidas en un portaobjetos (frotis), secadas y fijadas.

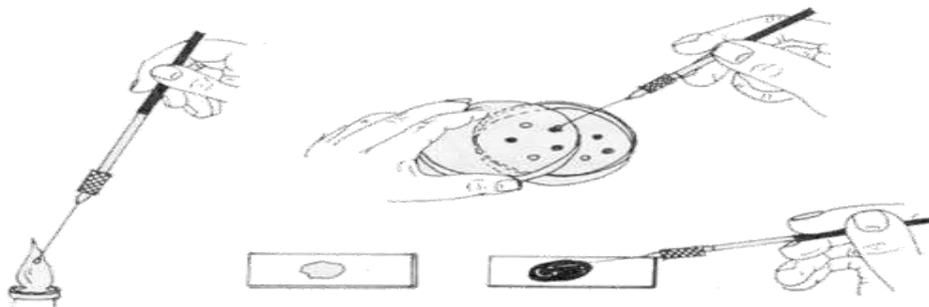


**Figura 4.1:** Pasos generales para realizar una tinción. 1. Extension, 2. Fijacion, 3. Adicion del colorante, 4. Lavado, 5. Secado al aire. [Guía de Farmacia](#)

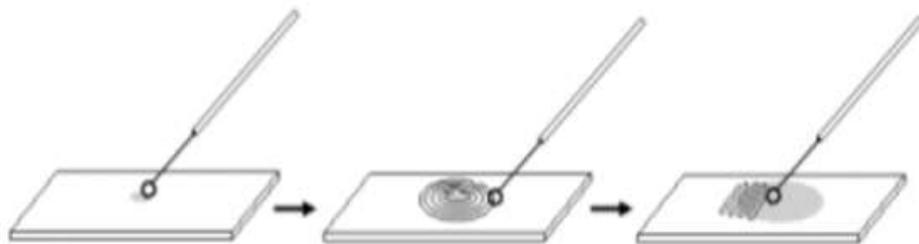
En la Figura 4.1 se pueden observar el esquema de los pasos generales para realizar una tinción. A continuación, se describen los 5 pasos generales que son comunes a toda coloración, ya sea simple, diferencial o estructural, a partir de muestras o cultivos microbianos.

**1. Preparación del extendido.** Se elige un portaobjeto bien limpio (de ser necesario se limpia con alcohol, papel servilleta). El extendido se puede realizar a partir de:

- a) Un cultivo microbiano en medio sólido, ya sea en placa de Petri o tubo (Figura 4.2). Cuando la muestra proviene de un cultivo en medio sólido, es necesario disponer previamente sobre el portaobjetos, una gota de agua o de solución fisiológica, en la cual se pueda disgregar el inóculo con suaves movimientos circulares con el ansa.
- b) Un cultivo bacteriano en medio líquido o muestra líquida. En el caso de muestras líquidas o cultivos microbianos en medios líquidos, esta se deposita directamente sobre el portaobjetos y se distribuye homogéneamente mediante movimientos circulares (Figura 4.3).



**Figura 4.2:** Preparación de un extendido a partir de un cultivo bacteriano en medio sólido.



**Figura 4.3:** Preparación de un extendido a partir de un cultivo bacteriano en medio líquido.

**2. Fijación del extendido.** Toda muestra biológica colocada sobre un portaobjetos, debe pasar por el proceso de fijación a fin de permanecer fijada al portaobjetos, durante el proceso de tinción y/o coloración. Existen dos procedimientos de fijación:

- a) *Fijación Química:* se realiza empleando alcoholes, los cuales fijan la muestra por deshidratación de las estructuras biológicas. Este tipo de fijación se utiliza en las coloraciones de extendidos de sangre o en las baterías de coloración histológica. Los alcoholes son diversos, tales como metanol o etanol en graduaciones adecuadas.

- b) *Fijación física*. Se realiza mediante el calor, ya sea pasando por la llama del mechero o apoyando sobre una superficie caliente. En el laboratorio de microbiología, se fija el frotis o extendido al calor, calentando suavemente a la llama del mechero hasta que se seque.

**3. Adición del colorante.** Una vez fijada la muestra en el portaobjetos se procede a la etapa de adición del o los colorantes para la coloración. Se cubre la zona de la muestra con suficiente cantidad de colorante y se deja actuar el tiempo necesario según la técnica en cuestión. Las coloraciones microbiológicas de rutina, emplean tiempos cortos de 30 segundos a 3 minutos por etapa y/o colorante. En el caso de coloraciones simples, esta etapa se realiza una única vez, con un solo colorante. En las coloraciones diferenciales y estructurales, esta etapa y la de lavado se repiten de acuerdo al protocolo de tinción.

**4. Proceso de lavado.** Luego de cumplido el/los tiempo/s de tinción, se procede a lavar el exceso de colorante con agua de canilla. El pH del agua corriente es el apropiado para lograr una coloración adecuada. No se utiliza agua mineral, agua destilada o solución fisiológica en este procedimiento.

**5. Secado.** Una vez finalizado el proceso de coloración, se deja secar el portaobjetos teñido al aire. Puede colocarse próximo a un mechero de Bunsen encendido, aprovechando el calor provocado por la llama para acelerar el proceso o bien, colocar el portaobjetos teñido entre dos pliegos de papel servilleta o papel de filtro que absorban el excedente de humedad.

Una vez seco el extendido, se procede a su observación microscópica, teniendo en cuenta las recomendaciones según el tipo de coloración empleado y el microorganismo a observar.

#### **4.4. COLORACIÓN SIMPLE**

Este tipo de coloraciones se utilizan poco en los laboratorios de rutina de bacteriología, debido a que únicamente nos dan información de la morfología microbiana, con lo cual no se puede establecer el grupo bacteriano en cuestión.

Las etapas de una coloración simple, comprenden:

1. Preparación del frotis o extendido
2. Fijación del extendido
3. Cubrir el extendido con el colorante (violeta cristal, fucsina, azul de metileno o safranina)
4. Dejar reaccionar el tiempo necesario (30 segundos a 3 minutos, según el colorante)
5. Lavar suavemente con agua corriente.

6. Dejar secar al aire o acelerar el proceso de secado colocando entre dos pliegos de papel servilleta y examinar bajo lente con aceite de inmersión.

Obsérvese las siguientes recomendaciones:

- Es buena práctica desechar el papel secante utilizado en este procedimiento y en otros que intervengan microorganismos patógenos.
- Los portaobjetos si no se conservan como elemento de referencia, se colocarán en solución desinfectante provisto por la catedra.

**Tabla 4.1: Ejemplo de una coloración simple**

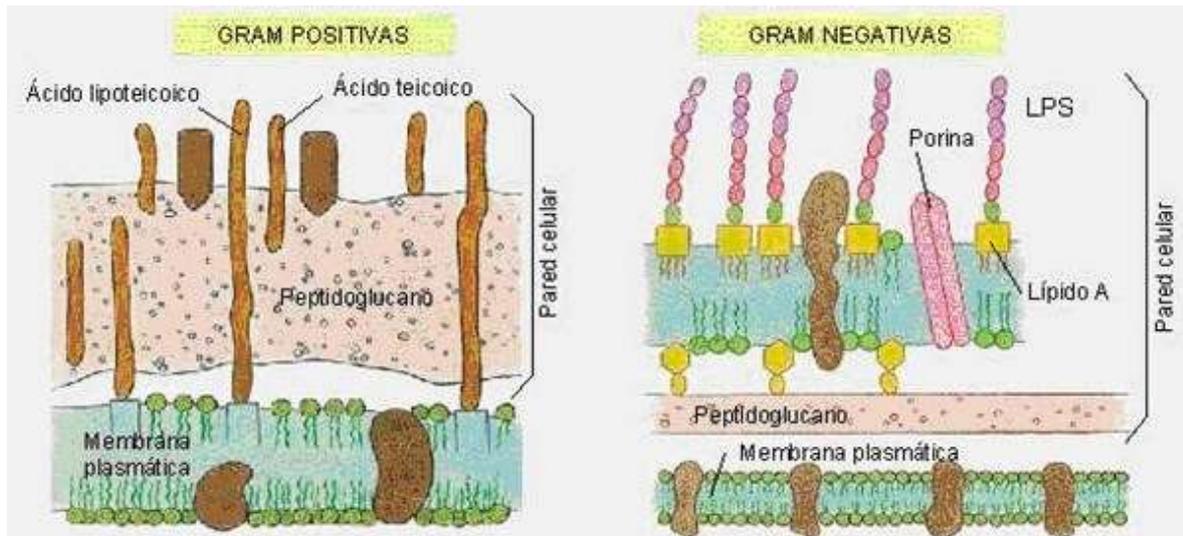
Tinción	Componentes		Propósito
<i>Azul de metileno de Loeffler</i>	Azul de metileno	0,3 gr	Coloración simple directa empleada para revelar morfología de microorganismos. Una de sus aplicaciones es en la identificación de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , en el cual los gránulos metacromáticos se tiñen intensamente con azul de metileno, diferenciándose del citoplasma azul más claro.
	Etanol, 95%	30,0 ml	
	Agua destilada	100,0 ml	

## 4.5. COLORACIONES ESPECIALES/ DIFERENCIALES

### 4.5.1. COLORACIÓN DE GRAM

La tinción de Gram está fundamentada en la naturaleza química de la pared celular de las bacterias. En la Figura 4.4, se ve esquematizados los componentes químicos de la pared celular de los dos más numerosos grupos bacterianos. Gram (+) y Gram (-):

- **Pared Gram (+):** Se destaca una capa densa y uniforme de 200 a 800 Å de Peptidoglicano (Mureina o glicopéptido) representando el 50% del peso seco. Otros elementos de la pared son ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos. En menor medida polisacáridos y proteínas.
- **Pared Gram (-)** El peptidoglicano o glucopéptido representa el 10% del peso seco formando una capa interna delgada de 20 a 30 Å, cubierta por capas externas de lipopolisacáridos, lipoproteínas y proteínas. Se reconoce una membrana externa (ME) con una bicapa lipídica asimétrica, atravesada por canales proteicos de porina y con el Lipopolisacarido (LPS), en su cara externa.



**Figura 4.4:** Representación esquemática de los componentes químicos de paredes bacterianas en función de su coloración diferencial con la técnica de coloración de Gram. Fuente: Murray (2017).

### Productos empleados en la Coloración de Gram.

A continuación, se detallan los productos empleados en la tinción de Gram:

- ◆ Colorante primario: Cristal Violeta
- ◆ Mordiente: Lugol
- ◆ Decolorante: Alcohol Acetona
- ◆ Colorante de contraste: Safranina o Fucsina básica diluida

### Etapas de la coloración de Gram:

Una vez preparado el extendido y realizada la fijación, se continúa con la coloración:

- 1) Se cubre el extendido con cristal violeta (colorante primario). - 1 minuto - se lava con agua de canilla
- 2) Se cubre el extendido con Lugol (mordiente) - 1 a 2 minutos - se lava con agua de canilla
- 3) se decolora con alcohol de 95° (decolorante). Pocos segundos, paso crítico. se lava con agua de canilla
- 4) Se cubre con safranina o fucsina básica (colorante de contraste). 1 minuto - se lava con agua corriente.
- 5) se seca suavemente al aire o sin frotar con papel secante.

Una vez que la preparación está totalmente seca, poner una gota muy pequeña de aceite de cedro y observar al microscopio con el objetivo de inmersión. Se enfoca, preferentemente, con el micrométrico. **Después de utilizar el objetivo de inmersión debe limpiarse suavemente con papel suave.**

La siguiente Tabla resume los pasos de la coloración de Gram en base a cada uno de los productos que emplea y a la reacción y coloración que va produciendo en las bacterias Gram (+) y Gram (-) durante el proceso de tinción (Tabla 4.2).

**Tabla 4. 2:** Coloración de Gram. Pasos de la tinción en base a cada uno de los productos que emplea y a la reacción y coloración que va produciendo en las bacterias

Paso de la Tinción	Producto que se emplea	Reacción y coloración de las bacterias	
		GRAM (+)	GRAM (-)
Colorante básico o primario	Cristal violeta (CV)	Bacterias color violeta	Bacterias color violeta
Mordiente	LUGOL (solución iodada)	Se forma el complejo CV-Yodo. Las bacterias continúan teñidas de violeta.	Se forma el complejo CV-Yodo. Las bacterias continúan teñidas de violeta.
Decoloración	Alcohol Acetona	Se deshidratan las paredes celulares. Se contraen los poros. Disminuye la permeabilidad. El complejo CV-I no sale de las células que continúan teñidas de color violeta.	Eliminación por extracción de los lípidos de las paredes celulares (LPS de ME). Aumenta la porosidad. El complejo CV-I se separa de la célula.
Colorante de Contraste	Fucsina básica o Safranina	Células no decoloradas, quedan teñidas de color violeta del colorante básico o primario	Células decoloradas, se tiñen de color rosado con el colorante de contraste o secundario.

Fuente: Desarrollado por Jerke Gladis, 2005.

### Examen del extendido coloreado con el Gram

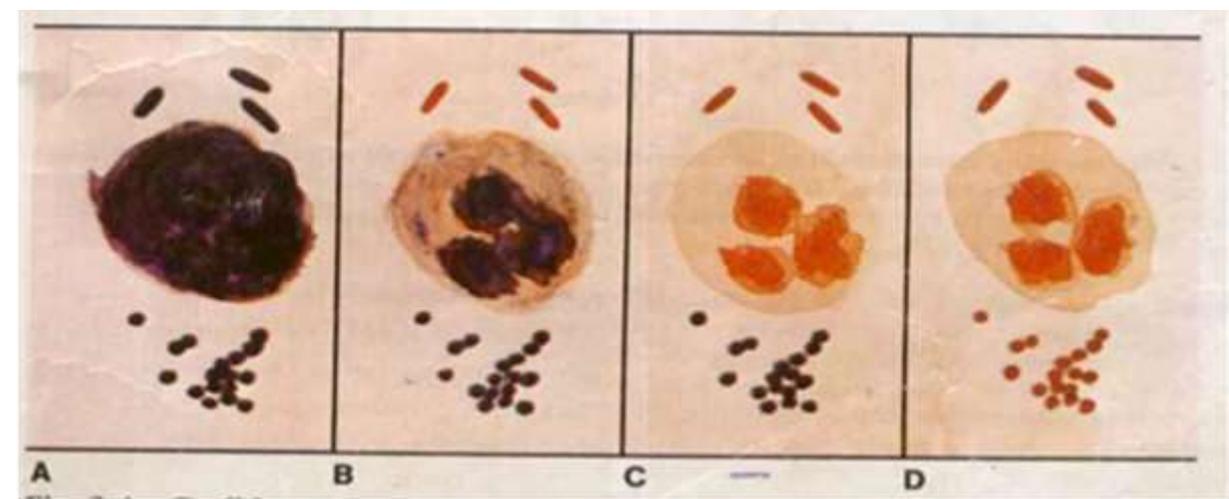
Pueden reducirse los errores de interpretación y el tiempo necesario para el examen de los extendidos coloreados con la tinción de Gram mediante el examen sistemático del portaobjeto, de la siguiente manera:

1. Un breve *examen macroscópico* del portaobjeto (en 5X o 10X) informará al examinador si la sustancia colorante ha quedado en el portaobjeto, que lado del mismo está coloreado, y si el frotis es demasiado grueso o está poco decolorado, muy decolorado o irregularmente coloreado.

2. En un examen microscópico con poco aumento (en 5X o 10X) se ven a menudo grandes formas fúngicas y por lo común es posible determinar las características de coloración de los núcleos celulares.

3. Mediante la lente de inmersión en aceite (100x), *evaluar la conveniencia técnica de la coloración*. Hay que insistir en que la mayoría de los errores de interpretación de los frotis coloreados con el Gram se deben a errores en la preparación del portaobjeto, con un extendido demasiado grueso, excesiva fijación por el calor que puede alterar la morfología normal de las bacterias y células y decoloración escasa o excesiva.

a. Se puede evaluar con rapidez si la coloración por el Gram es adecuada, comparando diferentes áreas del portaobjeto (con lente de inmersión en aceite). Las variaciones en los resultados de la coloración se observan en la figura 4.5. Los núcleos de granulocitos y los organismos Gram negativos en un área delgada del frotis deberán colorearse de rojo, y los organismos Gram positivos de púrpura (fig. 4.5 C). El hallazgo de bacterias rojas próximas a elementos celulares ligeramente purpúreos (decoloración marginal) en una parte más gruesa del frotis, confirmará que se encuentran organismos Gram negativos (fig. 5 B) y que no son bacterias Gram positivas decoloradas en exceso (Fig. 5 D). Los campos totalmente poco decolorados (fig. 4.5 A) indican sólo la presencia de bacterias pero no pueden distinguirse sus características de coloración.



**Figura 4.5:** Posibles variaciones en una coloración Gram. A y B- Coloración poco decolorada. C- Coloración IDEAL. D- Coloración muy decolorada.

b. Puede controlarse la técnica de coloración de Gram coloreando una muestra de flora bucal por ejemplo, que contiene organismos Gram negativos y Gram positivos y células epiteliales.

c. Si el frotis coloreado con el Gram es técnicamente inadecuado, hacer uno nuevo y volver a colorearlo.

4. *Cuidado con los artificios.* El material Gram positivo de forma irregular suele ser precipitado de Cristal Violeta de la coloración de Gram más que los cocos Gram positivos.
5. *Recordar que los organismos Gram positivos viejos, muertos o tratados con antibióticos, pueden aparecer como Gram negativos.* Porque sus propiedades físicas y químicas están alteradas y sus paredes celulares son más permeables al agente decolorante y hay menor retención del colorante principal.
6. *Reconocer las limitaciones de la coloración de Gram.* No constituye un método para cápsulas, esporas, micobacterias u hongos salvo algunas formas de levaduras. Esta coloración puede proporcionar indicios de la presencia de cápsulas o esporos por ello, deberán usarse otros medios de coloración más específicos para destacar estas estructuras.
  - a. Las micobacterias no captan bien la coloración de Gram, si hay sospecha de ello proceder a una coloración acidorresistente (Ziehl Neelsen).
  - b. Los hongos, por lo general, son de tamaño elefantiásico en comparación con la mayoría de las bacterias, (Figura 4.6). Si bien los hongos son nominalmente Gram (+) la mayoría se revela mal o no se revela. Como excepción algunas levaduras se colorean como Gram (+). Se detectan mejor los hongos con un montaje húmedo conveniente (como ser Lactofenol azul de algodón), examinado con objetivo seco de gran aumento (40X),
7. *Conservar el frotis.* Es parte importante de los datos básicos de la muestra. El portaobjeto debe guardarse o agregarse al informe. La inmersión en aceite se limpiará con papel absorbente suave.



**Figura 4.6:** Morfología y características de coloración con la tinción de Gram de organismos de hallazgo común. Todos estos organismos están observados en microscopio óptico con un aumento de 100X (lente de inmersión en aceite). 1. *Staphylococcus*. 2. *Streptococcus* y neumococos. 3. *Neisseria*. 4. Leucocito polimorfonuclear. 6. *Acinetobacter*. 7. *Micrococcus*. 8. *Corynebacterium* (difteroides). 9. *Nocardia* o *Actinomyces*. 10. Célula epitelial. 11. *Fusobacterium* y *Borrelia*. 12. *Candida*. 13. *Aspergillus* (los hongos superiores por lo general no captan la coloración de Gram). 14. *Bacteroides*. 15. *Haemophilus* (y otros organismos raros como *Pasteurella*). 16. *Vibrio*. 17. *Pseudomonas*. 18. Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Proteus*, *Salmonella*, etc). 19. *Clostridium*, *Bacillus* o *Lactobacillus*.

## 4.5.2. COLORACION DE ZIEHL-NEELEN

Otra técnica de coloración diferencial que depende de la composición química de la célula bacteriana es la coloración ácido alcohol resistente, que se emplea en la tinción de bacilos tuberculosos y otras micobacterias, denominados BAAR (Bacilos ácido alcohol resistentes). Estos contienen ácidos grasos (ácidos micólicos) de cadena larga de 50-90 átomos de carbono que les confieren la propiedad de impermeabilidad a los colorantes y su ácido-alcohol resistencia en las tinciones, resistencia a la acción letal de ácidos y álcalis, resistencia a la acción bactericida de los anticuerpos. Similar a las bacterias Gram (-) poseen una delgada capa de peptidoglicano o mureína. Otros elementos de interés, son los Lipoarabinomanano, Arabinogalactanos y eonfosfatidil inositol manosido. Figura 4.7.

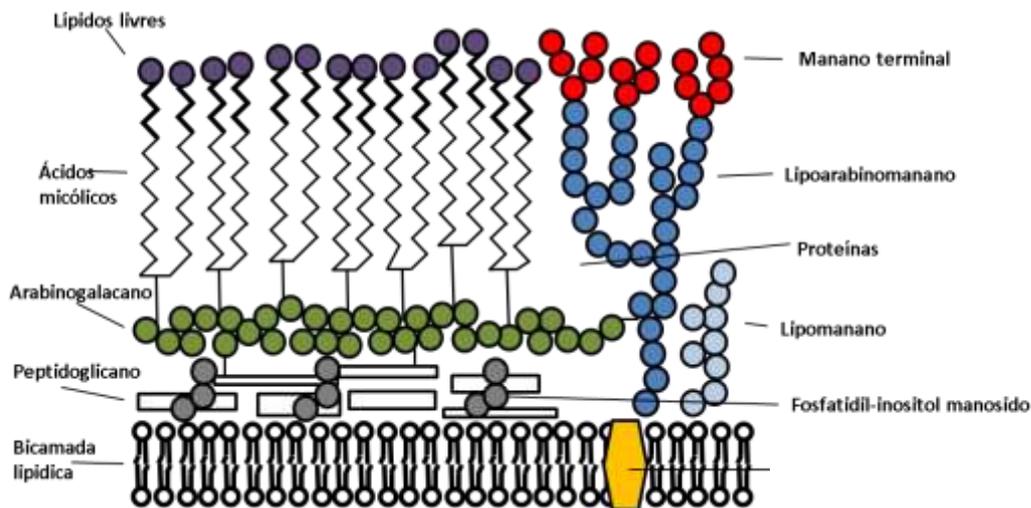


Figura 4.7. Esquema de los componentes químicos de la pared celular de BAAR

La tinción de estos microorganismos resulta difícil con los colorantes habituales, se usan colorantes básicos, con el agregado de un volumen controlado de ácido, y se aplican generalmente con calor. Una vez coloreado el BAAR es resistente al tratamiento siguiente con alcohol ácido, mientras que la mayoría de las demás bacterias pierde su coloración. Para la mejor apreciación, se aplica un colorante de fondo que contrasta con el bacilo. El método que se emplea con mayor frecuencia es el de Ziehl-Neelsen.

Los microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium marinum*, *Cryptosporidium* se caracterizan por sus propiedades de ácido-alcohol resistente. Son difíciles de colorear y, una vez logrado esto, no se decoloran con facilidad. Se han presentado muchas teorías para explicar esta propiedad de la resistencia ácida. El criterio más aceptable es que la misma está determinada por la permeabilidad selectiva de la membrana citoplasmática. La brillantez del color rojo se debe a la retención del colorante, carbolfucsina, en solución dentro

de la célula. Si la célula se desorganizara mecánicamente, se perdería su propiedad ácido alcohol resistente.

### **Técnica para la Coloración de Ziehl-Neelsen**

1. Colocar un trozo de papel de filtro que cubra el frotis sobre el portaobjeto fijado por el calor, después inundar el portaobjeto (y el papel) con **carbolfucsina**. Cubriendo el frotis con papel de filtro se impide su desecación cuando se lo somete al vapor y los posibles artificios resultantes.
2. Someter el **vapor durante 3-5 minutos** (no hervir ni deshidratar). Dejar descansar 5 minutos. **Lavar el portaobjeto** (quitando el papel de filtro) con agua corriente, en chorro lento.
3. **Decolorar** completamente con **alcohol-ácido** hasta que no aparezca color en el líquido de lavado. Enjuagar con agua corriente.
4. **Coloración de fondo** con un colorante de contraste como el **azul de metileno o verde malaquita**. Enjuagar con agua, dejar secar al aire. Observar con lente de inmersión en aceite.

Resultados: los bacilos acidorresistentes se teñirán de rojo, el fondo, los elementos celulares, y las bacterias que no son ácido alcohol resistentes tomarán el color del colorante de contraste (azul / verde)

### **Fundamento de la coloración de Ziehl-Neelsen**

El *fenol* forma parte del colorante es soluble en lípidos, y estos son importantes componentes de las bacterias ácido alcohol resistentes.

El *calentamiento*, favorece la solubilidad y por lo tanto la penetración de la fucsina fenicada en la micobacteria. El fenol también es soluble en alcohol y agua, aunque en menor grado que en lípidos.

El fenol con la fucsina forma el compuesto *fenol-color* (FC). Al ponerse este compuesto en presencia del citoplasma bacteriano, el fenol se encuentra en un medio donde su coeficiente de solubilidad es mayor y por lo tanto FC se fijará fuertemente y coloreará de rojo la bacteria.

En el tercer paso de la técnica, se agrega *alcohol-ácido*. Debido a la permeabilidad especial de la pared celular lipídica, penetran con dificultad y se encuentran con FC. El fenol se encuentra con dos sustancias en las cuales es soluble, pero como lo es más en los lípidos, la mayor parte del color quedará en la pared celular y una pequeña cantidad se perderá por solubilización en ácidos y alcohol. Este paso, el de la *decoloración*, es *muy importante*, y después de lavar con agua se debe observar a trasluz si no quedó colorante, caso contrario se repite el procedimiento hasta que las partes delgadas del preparado queden incoloras y las parte más gruesas rosadas.

Si se produce destrucción de la pared bacteriana, ya sea por medios físicos, químicos, quimioterápicos, antibióticos, etc, la capacidad de ácido alcohol resistencia se pierde porque el alcohol y el ácido entrarán en forma masiva y arrastrarán el colorante.

En general, la afinidad por el colorante está dada por el coeficiente de solubilidad del fenol en los lípidos y por la resistencia de la pared celular a la penetración de los colorantes.

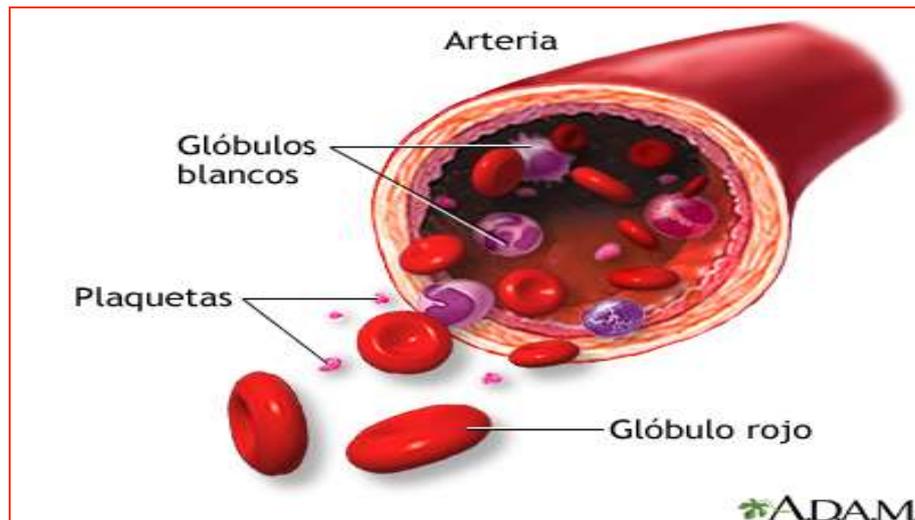
### **Examen del frotis tratado con coloración ácido alcohol resistente**

1. Con lente de inmersión, los bacilos ácido alcohol resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* son típicamente bastoncillos delgados, apenas curvos, que se tiñen de rojo. Pueden estar unidos formando cuerdas o como “cuentas de rosario” por la presencia en el cuerpo bacilar de puntos más coloreados..
2. En un frotis grueso o decolorado de modo insuficiente son posibles artificios acidorresistentes, como así también raspaduras del portaobjeto. Solo los microorganismos morfológicamente definitivos deberán considerarse como bacilos acidorresistentes.
3. No es posible efectuar la determinación de la especie de un organismo sobre la base de una coloración acidorresistente de la muestra sola.
4. La ácido alcohol resistencia de un organismo puede variar por factores como la edad, exposición a drogas, etc; también de acuerdo con el método de coloración. El *Mycobacterium tuberculosis* es ácido alcohol resistente en forma constante, pero no así el *M. leprae*, *Nocardia*.

### **→ 4.5.3. COLORACIÓN DE MAY GRÜNWARD – GIEMSA**

La técnica de May Grünwald-Giemsa es utilizada para colorear muestras de frotis sanguíneos, Líquido cefalorraquídeo o extendidos de médula ósea en la búsqueda de hemoparásitos, levaduras o elementos fúngicos que hayan invadido el torrente sanguíneo. Para la observación de bacterias se recurre a la coloración de Gram.

Esta coloración tiene la particularidad de lograr diferenciar cuali y cuantitativamente los principales elementos formes de la sangre (Figura 4.8), a la vez que permite visualizar microorganismos cuyo tamaño sea mayor a las 5 micras.



**Figura 4.8:** Principales componentes de la sangre.

Para ésta técnica se utilizan las siguientes soluciones colorantes:

**A) Solución de May- Grünwald** contiene eosina (colorante aniónico) y azul de metileno (colorante catiónico) disueltos en metanol.

**B) Solución de Giemsa**, que contiene eosina, azul de metileno y productos de la oxidación del azul de metileno (azur A, azur B, violeta de metilo y azul de metilo).

**Fundamentación teórica:** Los colorantes aniónicos se van a unir a las sustancias catiónicas (básicas) y los colorantes catiónicos a las sustancias aniónicas (ácidas) formando sales insolubles de diferentes matices de coloración. Los componentes celulares sanguíneos, son reconocidos por esta tinción como:

- ◆ *Componentes aniónicos* (ácidos) Al unirse con los tintes catiónicos se tiñen en tonos azules. Son llamados *basófilos*: DNA, RNA, proteínas, mitocondrias, ribosomas. Los núcleos de leucocitos neutrófilos, eosinófilos y basófilos, toman esta coloración. También son basófilos, los gránulos de granulocitos basófilos.
- ◆ *Componentes catiónicos* (básicos). Se unen a la eosina, tiñendo en variados tonos de rojos y naranjas. Se les llama *acidófilos* o *eosinófilos*. La hemoglobina toma esta tinción. En los frotis sanguíneos se observan con estos tintes a los globulos rojos y el citoplasma de eosinófilos.

## **4.6. COLORACIÓN DE ESTRUCTURAS**

### **4.6.1. Coloración de cápsulas**

La cápsula de las bacterias no tiene la misma afinidad por los colorantes que otros componentes de la célula, y por eso exige el empleo de métodos de coloraciones especiales.

Ejemplos:

- Método de Anthony
- Método de Muir
- Método de Hiss
- Otros.

### **4.6.2. Coloración de esporas**

Las esporas son relativamente resistentes a los agentes físicos y químicos y no se colorean con facilidad. En la coloración de Gram aparecen como cuerpos refráctiles no coloreados. En general, en los métodos especiales de coloración se requiere el calor para permitir la penetración del colorante en las esporas. Estas pueden descubrirse en el examen con campo oscuro. Ejemplo:

- Método de Dorner o su modificación.

### **4.6.3. Coloración de flagelos**

Los flagelos son apéndices frágiles, termolábiles y requieren un trato cuidadoso y la coloración por procedimientos especiales. El éxito de la coloración depende de la frescura y la eficacia del mordiente. Como los flagelos se hallan fuera del poder de resolución del microscopio óptico para poder visualizarlos es necesario aumentar su tamaño. Esto se consigue cubriendo su superficie con un precipitado de una suspensión coloidal inestable (el mordiente). El precipitado sirve como una capa de material teñible y cuando se aplica el colorante adecuado aparece la estructura filamentosa de los flagelos. Ejemplo:

- Método de Gray

### **4.6.4. Coloración de gránulos metacromáticos**

Existen diversos métodos para la coloración de gránulos metacromáticos. Se consideran las más usadas:

- Coloración con azul de metileno
- Coloración de Albert.

#### 4.6.5. Coloración de espiroquetas

En general las espiroquetas tienen poca afinidad para los colorantes estándar y requiere métodos y colorantes especiales, como el método de impregnación argéntica conocido con el nombre de Coloración de Fontana-Tribondeau.

La técnica más empleada es la observación con microscopio de Campo oscuro. Las espiroquetas, pueden ser visualizadas como “tirabuzones” brillantes contra un fondo oscuro (pag 38). Al mantener su movilidad, se distinguen fácilmente en muestras clínicas con sospecha de *Leptospiras* o *Treponema pallidum* (Sifilis),

---

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Forbes, B. A., Sahm, D. y Weissfeld A. (2009). *Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico*. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- Gardner P. y Provine H.T. (1979). *Manual de infecciones agudas bacterianas: Diagnóstico precoz y tratamiento*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- Inglis T. J. J., West A. P. (2001) *Microbiología Clinicolor*. Llanos Moreno (Edición Española), Madrid, España. Original: Sección Médica de Longman Group, U.K. Alhambra Longman, 1993.
- López-Jácome L. E., Hernández-Durán M, Colín-Castro C. A.,\* Ortega-Peña S.,\* Cerón-González G.,\* Franco-Cendejas R.\* (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*. Vol. 3, Núm. 1 pp 10-18
- Madigan M.T., Martinko J. M., Bender K. S., Buckley D. H., Stahl D. A. (2015) *Brock. Biología de los microorganismos*. 14ª Edición. Editorial Pearson. Madrid, España.
- Medvedeff, M.G., Bargardi, S, Jerke, G; Horianski, M.A.; Amer, L. (2006) *Guía de Trabajos Prácticos*. Catedra de Microbiología e Inmunología. 1º Parte. Editorial Universitaria de UNaM. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones.
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. (2017). *Microbiología Médica*. 8º Ed. Elsevier. España. Grafica Muriel.
- Winn W. C., Allen S. D., Janda W. M., Koneman E. W., Procop G. W., Schrenkenberger P. C. y Woods G. L. (2008). *Koneman. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas en color*. Edición 6ª. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.

---

*Profesoras responsables, 1º edición 2006. Dra Medvedeff Marta G.†, Dra Jerke Gladis*

*Profesoras responsables, 2º edición 2019: Bqca Esp. Chade Miriam, Dra Jerke Gladis*

## **Practica de Laboratorio N°4**

### **TÉCNICAS DE COLORACIÓN.**

#### **Consignas**

1. **Preparación de los frotis:** La catedra dispondrá de soluciones colorantes, material suficiente e instrumental apropiado para que cada alumno pueda preparar frotis/extendidos para llevar a cabo:
  - a. Coloración simple: Azul de metileno o Verde de malaquita
  - b. Coloraciones diferenciales: Gram, Ziehl Neelsen y May Grunwald Giemsa

#### **Materiales dispuestos por grupo de trabajo:**

- |                     |                                   |
|---------------------|-----------------------------------|
| -Portaobjetos       | -Aceite de inmersión              |
| -Ansas              | -Cultivos bacterianos y de hongos |
| -Mechero            | -Muestras diversas                |
| -Hisopos            | -Bandeja para coloraciones        |
| -Microscopio optico | -Pipetas                          |

#### **Soluciones colorantes dispuestos:**

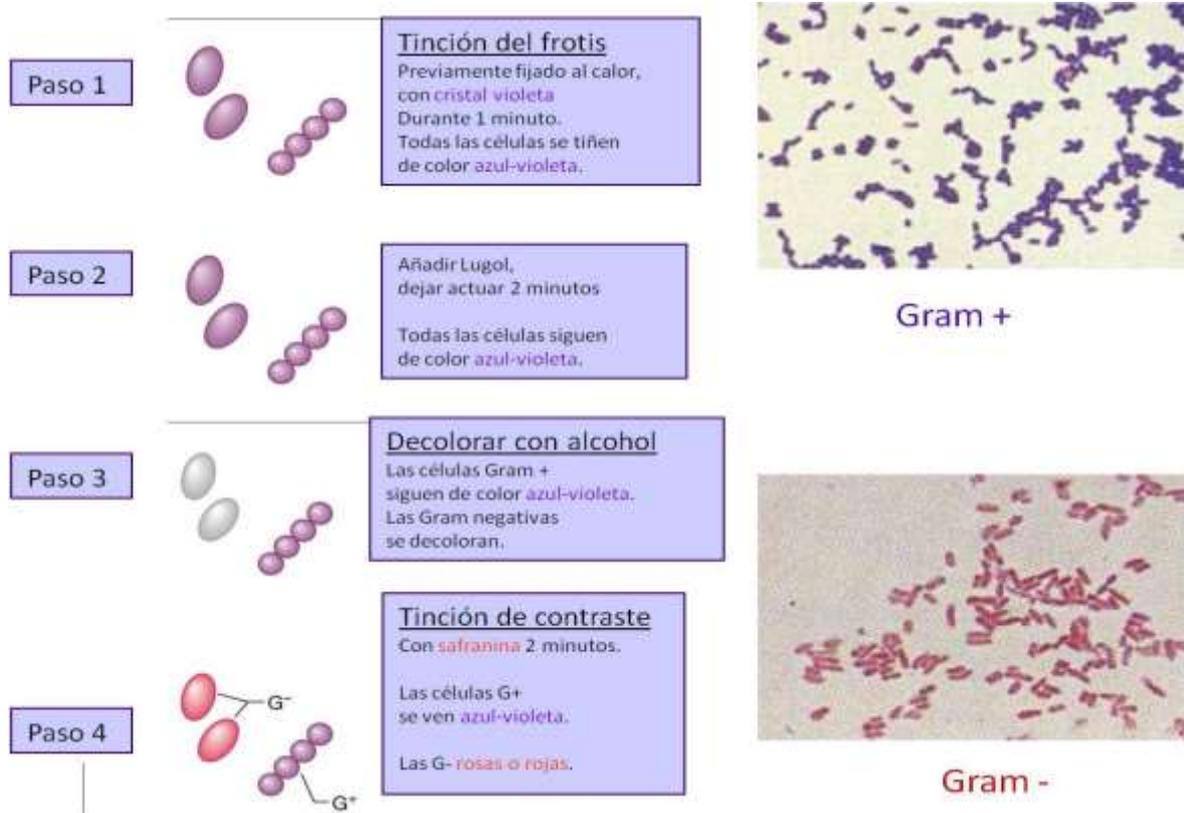
- a. *Coloración de azul de metileno.* Gotero conteniendo Azul de metileno al 0,3 gr %. Seguir los pasos detallados en el apartado 4.4.
  - b. *Coloración de Gram.* Se dispondrá batería de coloración conteniendo:
    - ◆ Cristal Violeta (colorante primario)
    - ◆ Lugol (Iodo de Gram)
    - ◆ Alcohol Acetona
    - ◆ Safranina o Fucsina básica (colorante secundario)
  - c. *Batería de coloración Ziehl Neelsen.* La batería dispuesta, contiene:
    - ◆ Fucsina fenicada (colorante primario)
    - ◆ Hisopo de algodón o equivalente para el calentamiento del preparado
    - ◆ Alcohol Acido
    - ◆ Azul de Metileno (colorante secundario)
3. **Observación de preparados microbiológicos coloreados:** Luego de aplicados los pasos para las coloraciones, cada grupo de trabajo realizara la observación microscópica, teniendo presente las recomendaciones para la coloración en cuestión.

## Coloración de Gram

Se seguirán los pasos descritos en los contenidos teóricos de coloración de Gram

2°) Preparación de extendidos

3°) Coloración y observación (Figura 4.9).



**Figura 4.9:** Coloración y observación durante los pasos de la coloración de Gram.

**Coloración de Ziehl-Neelsen.** La muestra habitual para la búsqueda de micobacterias es esputo. Seguir cuidadosamente las siguientes etapas:

Tomar un portaobjeto sin rayas, limpio y desengrasado.

1. Depositar sobre él una ansada de esputo. Se quemará el ansa previamente inmersa en un frasco de arena con alcohol.
2. Secar y fijar a la llama
3. Colocar el portaobjetos sobre la bandeja de coloración, seguir las etapas para Ziehl Neelsen, figura 4.10
4. Cubrir con fucsina fenicada
5. Pasar la llama de un hisopo (embebido en alcohol) debajo del portaobjeto hasta desprendimiento de vapores blancos. Suspender el calentamiento en ese momento. Dejar un

minuto y repetir el procedimiento hasta tres veces, con la precaución de no secar el preparado y evitar ebullición

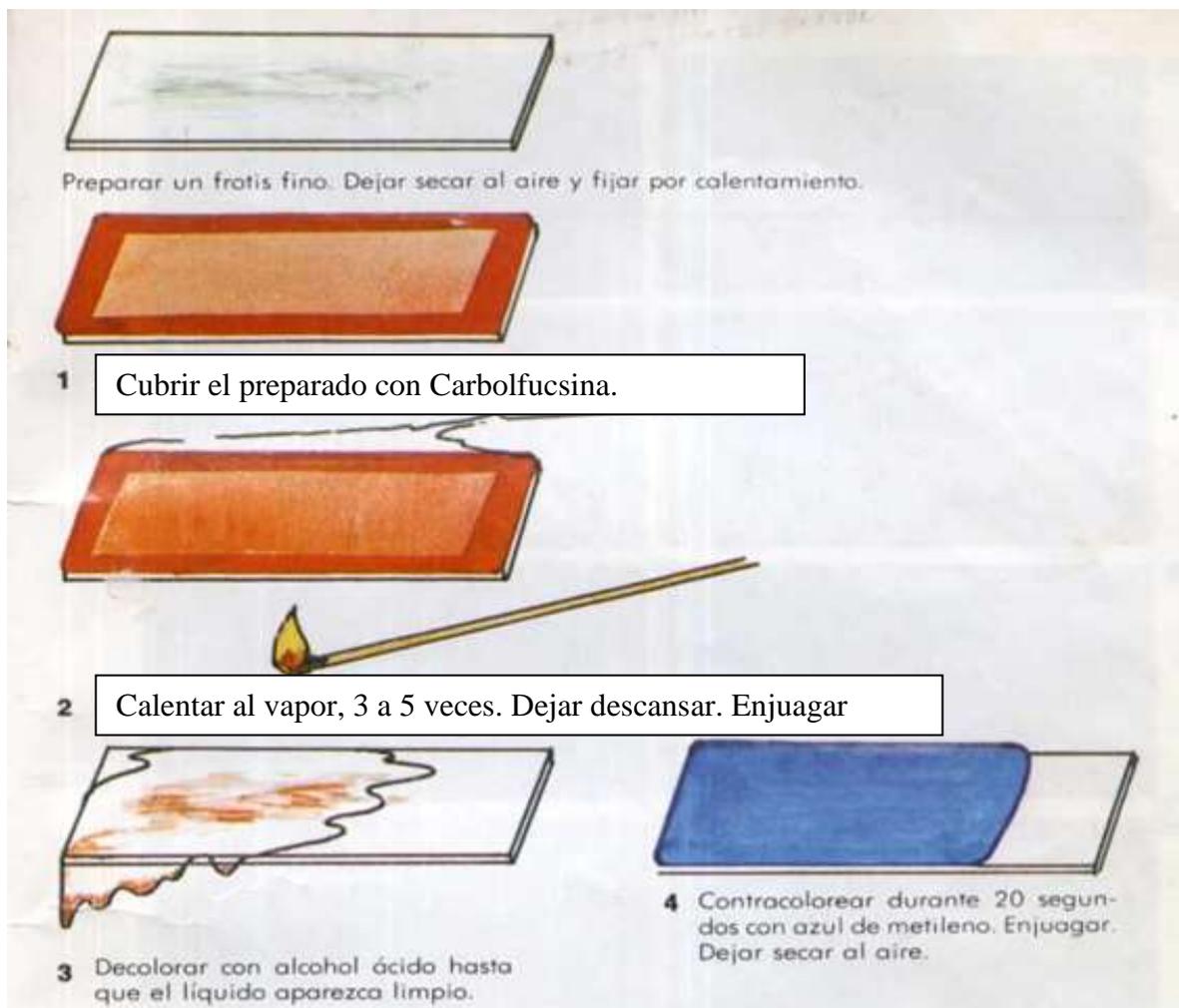
6. Cubrir con la solución decolorante durante 10 segundos y lavar rápidamente con agua. Repetir el procedimiento 3 a 5 veces hasta que el preparado este decolorado.

7. Cubrir con el colorante de contraste, Azul de metileno, durante 20 seg a 1 minuto.

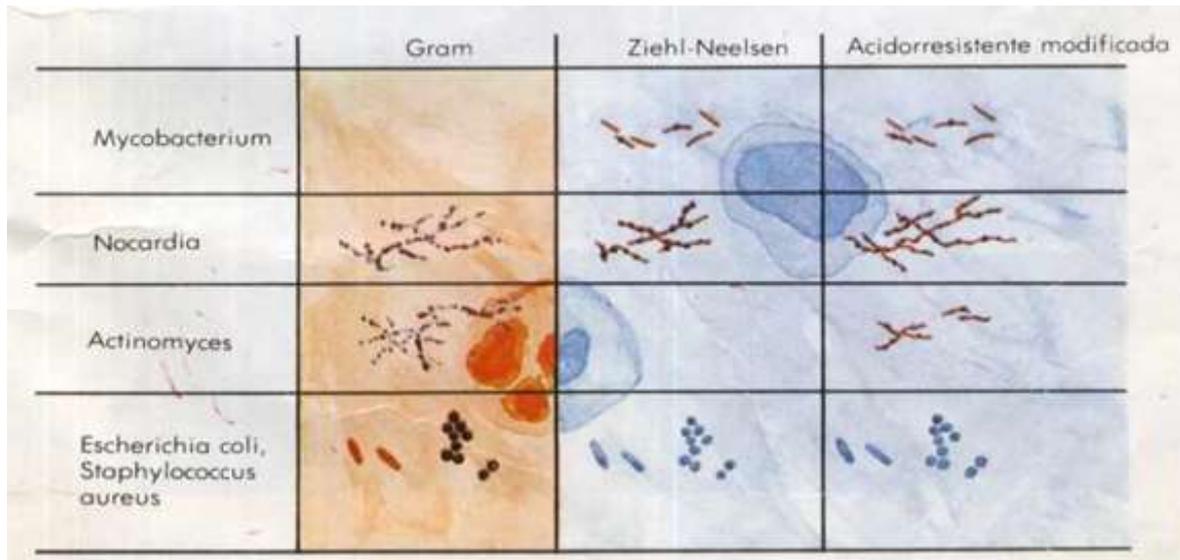
8. Lavar con agua

9. Secar al aire

10. Observar y esquematizar (Figura 4.11).



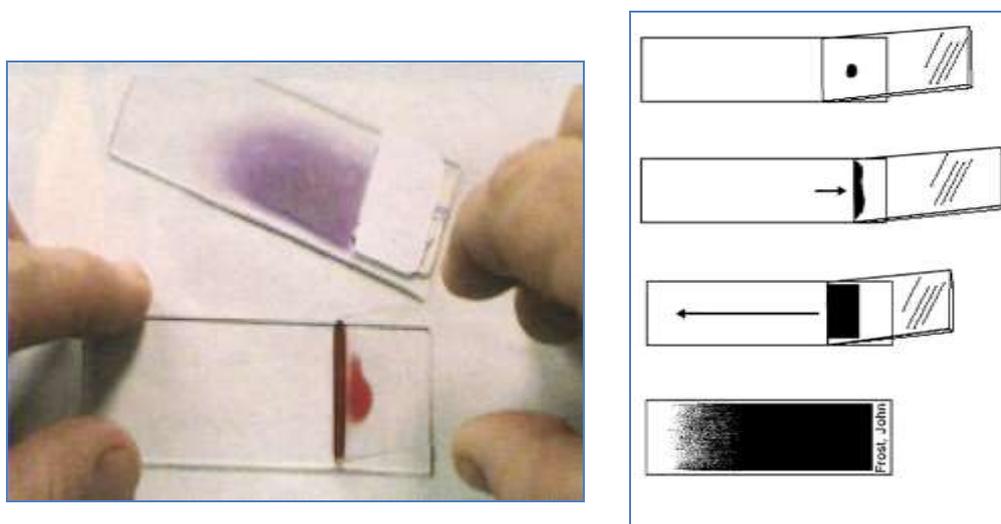
**Figura 10:** Coloración acidorresistente de Ziehl-Neelsen.



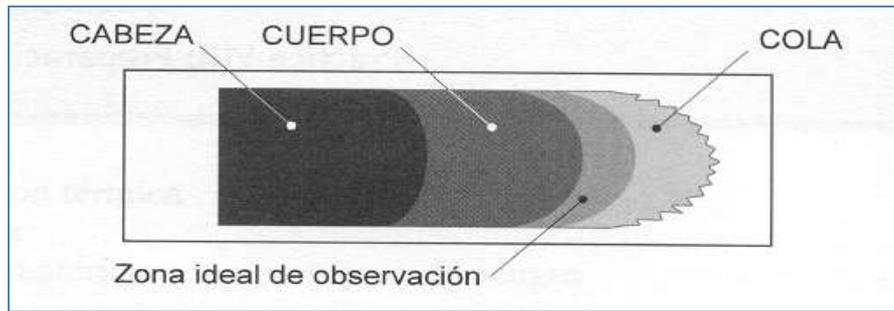
**Figura 4.11:** Comparación de coloraciones de Gram y acidorresistentes.

### Coloración de May Grönwald - Giemsa

1 - REALIZAR EL FROTIS / SECAR. Las muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo o médula ósea, se preparan preparando un frotis. En una portaobjetos sano y libre de grasas por limpieza con alcohol, colocar una gota de sangre. Con otro portaobjetos de borde sanos colocarlo sobre la gota de sangre a 45 ° y desplazarlo con un movimiento rápido y seguro hacia el otro extremo (Figura 4.12). Las zonas que presenta el frotis se pueden observar en la Figura 4.13.



**Figura 4.12:** Realización de un frotis sanguíneo.



**Figura 4.13:** Zonas de un frotis sanguíneo.

Antes de comenzar con la fijación, comprobar que el extendido se encuentre seco.

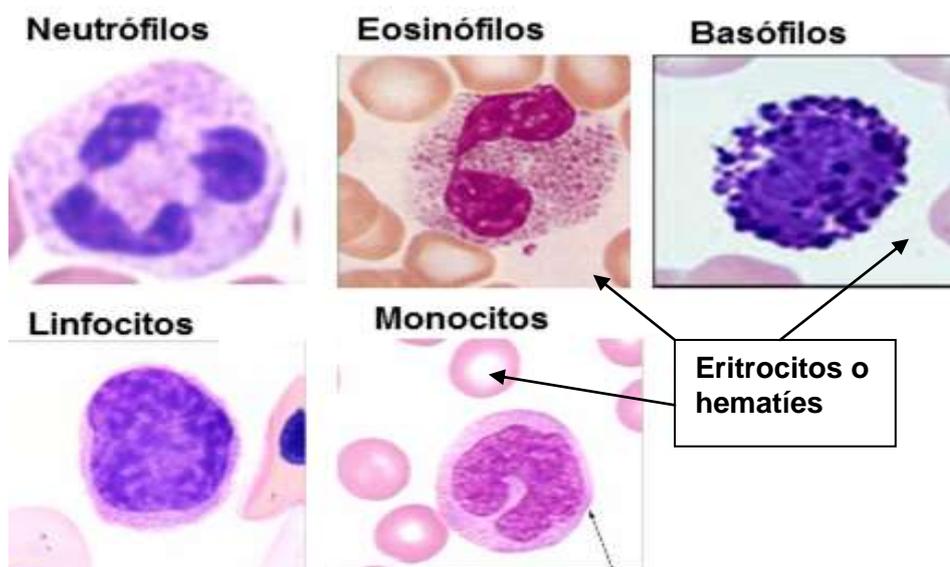
2. FIJACION: Colocar varias gotas de la solución de May Grünwald cubriendo todo el preparado y dejar actuar durante 2 ó 3 minutos.

3. LAVADO Y REHIDRATACIÓN: Lavar con abundante agua estabilizada (agua destilada con pH de 7) eliminando toda la solución anterior, y dejar el preparado bien cubierto de agua durante 1 minuto.

4- TINCIÓN CON GIEMSA: Colocar aproximadamente 12 gotas de Giemsa sobre el extendido cubierto de agua. Homogeneizar. Dejar actuar la solución durante 10 ó 15 minutos.

5. Lavar con abundante agua removiendo el colorante remanente y luego dejar secar.

6. Lectura al microscopio óptico con aumento 100X con aceite de inmersión (Figura 4.14).



**Figura 4.14:** Tipos celulares a observar en extendidos sanguíneos coloreados con la Técnica de May Grünwald-Giemsa.

## Trabajo Practico N° 5

### ACONDICIONAMIENTO DE MATERIALES PARA SU ESTERILIZACIÓN

#### **OBJETIVOS**

- *Conocer los protocolos y procedimientos para la obtención de materiales estériles.*
- *Aprender las técnicas para realizar una adecuada descontaminación y limpieza en función del grado de contaminación del material.*
- *Aprender el procedimiento para empacar diversos materiales de uso en microbiología.*
- *Aplicar los conocimientos adquiridos relacionando los materiales y los empaques correspondientes en función de los distintos métodos de esterilización a utilizar.*
- *Conocer las condiciones de almacenamiento y de conservación de materiales estériles.*

#### **INTRODUCCIÓN**

El propósito de un estudio microbiológico es conocer con rapidez y exactitud información referente a la presencia o ausencia de un agente microbiano potencialmente implicado en una infección, contaminación, deterioro u otro proceso.

Los materiales a ser usados en un procedimiento microbiológico deben estar libres de microorganismos viables a fin de evitar su desarrollo durante el estudio de las muestras, esto se logra mediante la esterilización.

En el laboratorio de microbiología es frecuente el empleo de diversos tipos de recipientes, medios de cultivo y dispositivos de siembra. Éstos tienen una gran influencia en la calidad de los resultados por lo que se debe prestar especial cuidado en la preparación previa al proceso de esterilización.

#### **5.1. Elaboración de productos estériles**

Aunque todos los materiales no estériles que entran en contacto con una muestra son potenciales vehículos de microorganismos, no todos precisan someterse al mismo proceso de descontaminación y limpieza previo a la esterilización.

**A.** Si tuviéramos materiales de laboratorio y equipos contaminados con microorganismos potencialmente patógenos o material biológico los pasos a seguir para el acondicionamiento previo a su esterilización son:

1. Esterilización descontaminante o desinfección.
2. Limpieza.
3. Secado.
4. Revisión.
5. Armado y acondicionamiento de los materiales.
6. Rotulado.

7. Esterilización del material.

8. Conservación del material esterilizado.

**B.** Si el material del que disponemos es material que no ha estado en contacto con microorganismos potencialmente patógenos o material biológico no se realiza el paso 1, se procede a efectuar el procedimiento a partir de la limpieza, paso 2.

**C.** Si el material del que disponemos es material limpio y seco, se procede a trabajar a partir del paso 4.

## **5.2. Pasos a seguir en la obtención de materiales estériles para uso microbiológico**

### **5.2.1. Esterilización descontaminante o desinfección**

La esterilización descontaminante o la desinfección se realiza cuando se trata de material contaminado con microorganismos potencialmente patógenos o con material biológico. La descontaminación o la desinfección permite la eliminación o la reducción de la biocarga de un objeto inanimado dejándolo seguro para su manipulación.

La esterilización descontaminante se realiza en autoclave a 121°C y 1 atm de presión, durante 20 a 30 minutos. Ej. Tubos, placas de Petri, frascos, pipetas, etc.

La desinfección consiste en sumergir completamente el material en una solución desinfectante durante aproximadamente un día, dependiendo de la solución desinfectante. Se pueden utilizar soluciones de hipoclorito de sodio al 0,5%, formaldehído al 8%, glutaraldehído al 2%, peróxido de hidrógeno entre 6-7,5%, fenol, etc. Ej. Pipetas, varillas de vidrio, espátulas, porta objetos, etc.

### **5.2.2. Limpieza**

Durante este proceso se deben tomar las precauciones correspondientes utilizando métodos de barrera para la protección del operador:

- Guantes resistentes.
- Camisolín impermeable.
- Protectores oculares (si hay riesgo de salpicaduras en los ojos).
- Pantallas protectoras.

Los métodos de limpieza del material deberán adaptarse al tipo de sustancia que se necesita remover.

**5.2.2.1. Objetivos de la Limpieza:** La limpieza es un procedimiento que siempre debe preceder al proceso de esterilización de materiales. La limpieza se considera el paso más importante dentro de la elaboración de productos estériles. La esterilización nunca podrá ser alcanzada sin una correcta limpieza. La limpieza permite:

1. *Extraer la suciedad visible de los materiales:* tejidos, sangre, partículas extrañas, restos de medio de cultivo, etc. La suciedad actúa protegiendo a los microorganismos del contacto

con los agentes letales (desinfectantes o agente esterilizante) y reaccionan e inactivan a los agentes de limpieza. Al eliminar la suciedad también se eliminan los nutrientes que pueden facilitar la supervivencia de los microorganismos y se separan grandes cantidades de organismos asociados a la suciedad.

2. *Reducir la población microbiana residente sobre los materiales* (carga microbiana): con la limpieza la contaminación inicial existente para la posterior esterilización es inferior, lo que aumenta la eficacia de los métodos de esterilización ya que deberán eliminar menor cantidad de microorganismos.
3. *Proteger los instrumentos contra la corrosión*: los ejes o bisagras de instrumentos pueden almacenar sedimentos de suciedad causando corrosión, la que puede provocar daños sobre los instrumentos e incluso convertirlos en inútiles.
4. *Garantizar la seguridad de las acciones posteriores a desarrollar sobre los equipos y materiales*: después de la limpieza los materiales o instrumentales deben ser inspeccionados, preparados y empaquetados para su esterilización. La limpieza asegura que estas acciones se realicen en forma más segura.

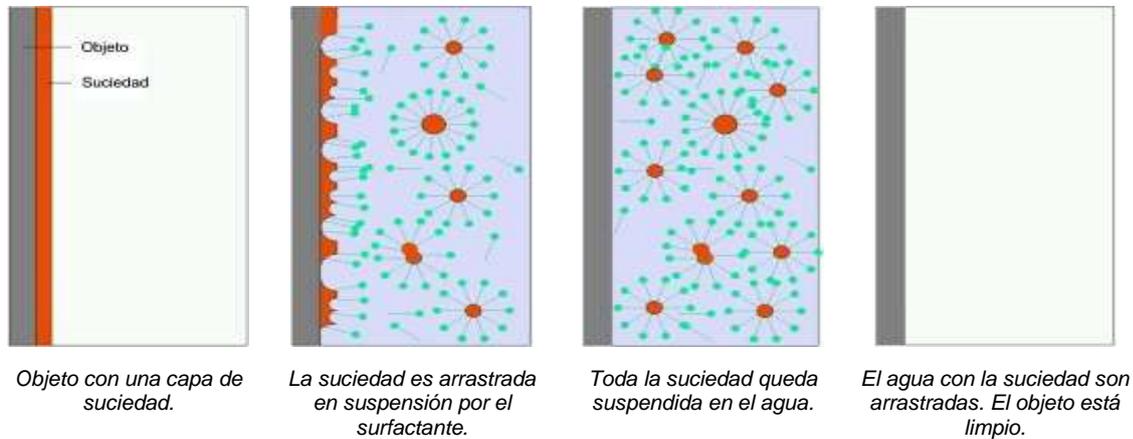
#### **5.2.2.2. Factores esenciales en el lavado**

**a. El disolvente:** el agua es el portador en el que la suciedad, de los materiales a ser lavados, es extraída, disuelta, suspendida y transportada. Para una adecuada limpieza, es esencial que la suciedad sea disuelta o que de alguna manera sea suspendida en el agua para permitir la extracción de los residuos. El agua puede suspender muchas sustancias, sin embargo existen ciertas propiedades que provocan que el agua no sea idónea para la eliminación de algunos residuos como el caso de aceites, grasas y proteínas.

El agua que contiene minerales disueltos como calcio, cloro, magnesio y fosfatos se denomina agua dura. A temperaturas elevadas, estas sales no son solubles en el agua y tienden a formar una capa dura, llamada sarro, sobre las superficies tratadas con esta agua. Esta capa no es un buen conductor del calor reduciendo la eficacia del método de esterilización por calor. También produce depósitos sobre los equipos, afectando su funcionamiento. Para la limpieza de los materiales se recomienda utilizar agua blanda que es aquella que no contiene minerales o solo posee una pequeña cantidad de ellos.

**b. La acción química:** no hay un agente limpiador que remueva todo tipo de suciedad. Para el lavado se emplea un detergente que es un limpiador compuesto por un agente surfactante que disminuye la tensión superficial, un agente de limpieza que es el principio activo y un agente quelante o secuestrante. El detergente con agua es utilizado para absorber y suspender la suciedad y los gérmenes (Figura 5.1). El surfactante reduce la tensión superficial del agua pudiendo esta esparcirse y mojar las superficies, además es capaz de disolver grasas, aceites

y sedimentos creados por sustancias químicas. Los surfactantes pueden ser catiónicos, aniónicos o neutros/no iónicos. Los productos de limpieza pueden contener agentes químicos adicionales tales como biocidas, sustancias alcalinas, enzimas, inhibidores de corrosión, disolventes, etc.



**Figura 5.1.** Eliminación de la suciedad presente en un objeto con agua donde se ha añadido un surfactante. La eliminación puede verse favorecida por una acción mecánica, como el cepillado y el arrastre. **Fuente:** Huys J., 2015.

**c. La acción mecánica:** el frotado, cepillado, rociado mediante agua a presión, o lavado ultrasónico ayuda a desprender la suciedad de las superficies.

**d. El calor:** mejora el poder de dilución del agua y del jabón o del detergente.

**e. El tiempo:** se necesita un tiempo mínimo de exposición para que las acciones antes mencionadas sean efectivas sobre los materiales.

### 5.2.2.3. Lavado manual

Se realiza con agua blanda a temperatura entre 40-50°C empleando un detergente biodegradable que deje poco o ningún residuo. Se debe evitar utilizar productos que dañen o alteren la superficie de los materiales.

La limpieza manual puede ser realizada usando diversas herramientas: cepillos de cerdas duras o blandas empleados para la limpieza externa o interna si se trata de objetos tubulados, paños suaves o esponjas, pistola a presión, agitador de instrumentos, etc.

El cepillado debe realizarse debajo del nivel del agua para evitar la formación de aerosoles tratando de llegar a los lugares más inaccesibles con diferentes medidas de cepillos. Se deben retirar los restos de rótulos: marcador indeleble, cinta adhesiva, etc.

Nunca se debe frotar la superficie con polvos limpiadores domésticos, abrasivos, lana de acero, esponja de metal, cepillos metálicos, etc. ya que estos rayan las superficies, dañan los metales y aumentan las posibilidades de rayado y corrosión.

Se enjuaga solo cuando se está seguro de haber removido toda la suciedad del material, repetidas veces bajo el chorro de agua corriente, calidad potable, a fin de asegurar la eliminación de la solución limpiadora y luego si es necesario se enjuaga con agua destilada.

Si se requiere limpiar material de vidrio que tiene manchas de grasa o de difícil remoción, se recomienda sumergirlo en una solución de dicromato de sodio o potasio en ácido sulfúrico concentrado (mezcla sulfocrómica) durante 24 horas.

Luego se enjuaga con abundante agua y finalmente con agua destilada.

### **5.2.3. Secado**

Es importante secar los materiales inmediatamente luego del enjuague para evitar o disminuir la contaminación posterior.

Es habitual realizar el secado manual, colocando el material en canastos de alambre, boca hacia abajo o sobre papel o paño de tela absorbente; a temperatura ambiente, o en estufa a 60 – 80°C.

También se acepta el secado mediante el uso de un paño suave de tela absorbente o de fibra de celulosa, cuidando que no queden pelusas sobre la superficie o interior de los materiales.

### **5.2.4. Revisión**

El material limpio y seco debe ser sometido a una minuciosa inspección y verificación antes de proceder a la preparación de los paquetes para detectar fallas en la limpieza y el secado, así como alteraciones de integridad y de funcionalidad de los artículos.

Se realiza una inspección visual cuidadosa de los materiales, los que deben estar libres de cualquier tipo de suciedad o de depósito remanente, de corrosión, de daño, tal como quebradura o de vestigios de rotulado.

También se inspecciona la funcionalidad de cada artículo, verificando por ejemplo el corte de tijeras, etc.

### **5.2.5. Armado y acondicionamiento de los materiales**

#### **5.2.5.1. Armado de los paquetes**

Los objetos que se someterán a un proceso de esterilización deben estar envueltos.

La finalidad de un sistema de envoltorio es el de contener los objetos y resguardarlos de la contaminación por suciedad, polvo y microorganismos.

El paquete debe mantener la esterilidad de su contenido hasta el momento de su apertura.

El armado y el contenido del paquete debe responder a:

- **Necesidad de uso:** contener la cantidad necesaria del material para un solo procedimiento.
- **Facilidad de uso:** ser diseñado para permitir el fácil uso de su contenido, esto es en lo relativo a su tamaño, ordenamiento interno, apertura aséptica, etc.
- **Seguridad de procesamiento:** permitir el ingreso y la libre circulación del agente esterilizante en todo su contenido. El paquete no debe estar sobrecargado y no se debe comprimir los materiales en su interior.

## **Materiales de empaque**

### **Condiciones mínimas que debe reunir un material utilizado como envoltorio**

El material de empaque debe:

- Ser barrera para evitar la contaminación con: microorganismos, polvo y suciedad.
- Ser compatible con el método de esterilización y permeable al agente esterilizante.
- Permitir la identificación del material estéril.
- Permitir retirar el material estéril sin dificultad (flexible).
- Ser repelente al agua.
- Estar libre de perforaciones y ser durable.
- Ser resistente a: la rotura, los pinchazos, las abrasiones y la humedad.
- Ser económico y disponible.

El material de empaque no debe:

- Contener sustancias tóxicas, ni desprender olor, pelusas, fibras, tintas u otro tipo de sustancias.
- Combinarse con el agente esterilizante.
- Reaccionar con el material que se empaqueta.

### **Tipos de materiales usados para envoltorios**

Se puede emplear todo tipo de materiales para proteger de la re-contaminación al material sometido a esterilización, entre los que podemos mencionar:

- Telas
- Papel
- Contenedores rígidos
- Polímeros

## **Telas**

- *Telas tejidas.* Las adecuadas son de 100% algodón ó combinación de algodón con poliéster. Apropriadas para paquetes pesados que necesitan un embalaje resistente. Son reutilizables. Compatibles para la esterilización a vapor y por óxido de etileno.

- *Telas no tejidas.* Son una combinación de celulosa más fibras sintéticas ó 100% fibras sintéticas. Son descartables. Adecuadas para esterilización a vapor y por óxido de etileno.

## **Papel**

- *Papel de diario.* Inapropiado para un proceso de esterilización. Posee muy mala calidad. Las resinas de las tintas enmascaran a las esporas y poseen sales tóxicas (Pb y Hg). Presenta poca resistencia al desgarro y a la mancha.

- *Papeles reciclados.* Papel sulfito y madera. Presentan una calidad similar. Preparados con papeles de reciclaje y blanqueados con sulfito de sodio. Su fabricación no se halla estandarizada.

- *Papel Kraft.* Se obtiene de la pasta de celulosa blanqueada. Fabricado según norma IRAM 3106. Adecuadas para esterilización a vapor y por óxido de etileno.

- *Papel grado quirúrgico o grado médico.* Se fabrica con celulosa importada de países nórdicos. No tiene el agregado de blanqueadores ópticos. Su fabricación se halla estandarizada (*British Standards* 6255:1989, EN 868-4, ISO 11607-1). Es ideal para el proceso de esterilización ya que es permeable al aire y al agente esterilizante, pero impermeable a las partículas portadoras de bacterias y los líquidos. Puede ser utilizado para esterilización a vapor y por óxido de etileno. No debe ser reutilizado.

- *Papel crepe de grado quirúrgico.* Fabricado con pasta de celulosa según estándares británicos (BS 6254:1989). Se utiliza para paquetes de mayor volumen en reemplazo de las telas. Se puede usar para esterilización a vapor y por óxido de etileno. No debe reutilizarse.

- *Papel mixto o bolsa pouch.* Es una combinación de papel de grado médico y un polímero transparente o Tyvek y un film transparente. Compatible con esterilización a vapor, por óxido de etileno y con vapor de formaldehído.

## **Contenedores rígidos**

- *Contenedores rígidos con filtro.* Pueden ser de aluminio, acero inoxidable, plástico o plástico con combinaciones metálicas. Estos contienen filtros bacterianos o válvulas que aportan una biobarrera. No se rompen, no largan fibras, no se contaminan y pueden ser transportados con facilidad. Usados para esterilización a vapor si presentan perforaciones.

- *Contenedores rígidos sin filtro.* Son cajas de acero inoxidable, cerradas que transmiten el calor por conducción. Usados para esterilización con calor seco.

## Polímeros

Constituyen una barrera ideal para los microorganismos y el polvo permitiendo un almacenamiento prolongado.

- *Polietileno*. Es termolábil por lo que es apropiado para esterilizar por óxido de etileno y radiación ionizante.

- *Cloruro de polivinilo (PVC)*. Lábil a la temperatura y a la radiación ionizante con formación de etilenclorhidrina, además absorbe el óxido de etileno y lo elimina muy lentamente.

- *Polipropileno y policarbonatos*. son termostables (140-150°C). También son adecuados para la esterilización por plasma de peróxido de hidrógeno.

- *Nylon (poliamida)*. Es estable a la temperatura (180°C) y permeable al vapor, pero no soporta vacíos por lo que se rompe al ser usados en autoclaves de vapor. No es adecuado para esterilización por radiación ionizante ni por óxido de etileno.

- *Tyvek*. Es un polímero sintético compuesto por fibras de polietileno en una hoja semejante al papel. Permeable al aire, al óxido de etileno o a cualquier otro gas esterilizante. Termosensible por lo que no debe usarse a temperaturas superiores a 65°C. Envoltorio de elección para la esterilización con plasma de peróxido de hidrogeno y compatible con oxido de etileno.

En la medida que sea posible se debe desterrar el uso de tambores metálicos, papel de diario y envoltorios de material reciclado.

El tipo de material de envoltorio se debe seleccionar de acuerdo al método de esterilización a emplear (Tabla 5.1).

**Tabla 1.** Tipos de envoltorios de acuerdo al método de esterilización.

MÉTODO DE ESTERILIZACIÓN	ENVOLTORIO POSIBLE
<b>Esterilización por calor húmedo</b>	-Papel grado quirúrgico (ideal) -Papel Kraft norma IRAM 3106 -Cartulinas -Tela tejida/no tejida -Pouch polipropileno -Vidrios -Contenedor rígido perforado con filtro
<b>Esterilización por calor seco</b>	-Caja de metal -Papel aluminio -Vidrios -Poliamida
<b>Esterilización por oxido de etileno</b>	-Papel grado quirúrgico -Papel Kraft norma IRAM 3106 -Pouch polietileno/polipropileno -Polietileno baja densidad -Tela tejida/no tejida -Polipropileno -Contenedor rígido perforado con filtro
<b>Esterilización por plasma de peróxido de hidrogeno</b>	-Polipropileno -Pouch de Tyvek

Fuente: Adaptado de Robilotti y Cousso, 2004.

Dentro de cada paquete se debe colocar un indicador interno del proceso de esterilización, cuyo viraje ha de ser chequeado en el momento de la apertura.

### **Cierre de la envoltura**

El propósito del cierre de la envoltura es mantener la esterilidad del contenido de los paquetes después de la esterilización y durante el almacenamiento, la distribución y el uso. Debe ser seguro y evitar todo tipo de apertura accidental de los paquetes. Debe permitir una posterior apertura aséptica y de fácil técnica para evitar caídas, roturas del material y/o contaminación del mismo.

Se puede utilizar:

- Hilo de algodón.
- Cinta adhesiva.
- Bandita de goma.
- Termosellado.
- Doblado manual.

No utilizar:

- Ganchos.
- Alfileres.
- Otros elementos cortantes.

Estos pueden perforar el material de protección del artículo.

### **5.2.5.2. Acondicionado de materiales**

**Tubos de ensayo, erlenmeyers y botellas:** aquellos materiales que no poseen roscas o tapas aptas para ser sometidos a esterilización se les debe preparar un tapón de algodón y gasa. Este debe ser confeccionado de tal manera que se ajuste perfectamente al cuello del recipiente, que pueda extraerse sin esfuerzo y cuidando que no quede flojo. En el caso de los tubos de ensayo, de hemólisis, etc. cargados con sustancias se deben ubicar boca arriba en cestas de alambre o latas y cubrir la parte superior del envase con un capuchón de papel, si es necesario sujetarlo usando piolín, cinta adhesiva o bandita elástica. De esta manera se protege al algodón del humedecimiento por acción del vapor durante la esterilización o inmediatamente después, lo cual favorecería una posterior contaminación. Los tubos vacíos una vez acondicionados pueden ser envueltos en paquetes teniendo la precaución de colocarlos en la misma dirección para evitar contaminarlos durante la apertura de los mismos. A los erlenmeyers y botellas luego de colocarles el tapón se les cubrirá con un capuchón de papel en forma individual. Si los recipientes a esterilizar contienen soluciones acuosas, nunca deben llenarse totalmente; cargar solo el 70% de la capacidad para dejar una cámara de aire lo que evitará que se moje el tapón.

**Tubos de ensayo y frascos con tapa a rosca:** deben ser ligeramente desenroscados (para permitir el ingreso del vapor), ubicarlos igual que en el caso anterior en cestas o paquetes y continuar los mismos pasos.

**Pipetas:** colocar un trozo de algodón en el extremo superior, de forma tal que no quede muy apretado ni tampoco flojo (En este caso el algodón actúa como filtro, no como tapon). Cortar tiras de papel y envolverlas en forma individual. Preparar paquetes de tamaño regular, con pipetas de igual capacidad. Rotular señalando en cada caso volumen y una flecha que indicará la parte inferior de la pipeta. En caso de disponer de pipeteros, guardar las pipetas acondicionadas en forma individual dentro del cilindro, cuidando que todas las pipetas queden en el mismo sentido. Colocar la tapa dejando los orificios abiertos.

**Placas de Petri:** envolver con papel en forma individual o en pares.

**Agujas y jeringas:** envolver en papel o en tubos especiales. Las jeringas se deben acondicionar separando embolo y camisa.

**Hisopos:** introducir varios hisopos en un tubo de vidrio y colocar una tapa de plástico o tapón de algodón. Para su acondicionamiento individual envolver el extremo superior del hisopo con un trozo de algodón que se ajuste a la boca del tubo de vidrio, este servirá de tapón.

**Materiales de plástico y de goma:** proceder de la misma manera que los materiales descritos previamente, teniendo en cuenta la resistencia de los mismos a las temperaturas de esterilización. En caso de mangueras de goma, se deben humedecer previamente el lumen con agua destilada y disponerlas en forma de espiral de tal manera tal que no formen acodos para facilitar su esterilización.

**Sustancias pulverulentas y cristalizadas:** estas sustancias como talco, caolín, subnitrito de bismuto, y otras que toleren temperaturas de 160-165°C se esterilizan por calor no acuoso, en la estufa u horno de aire caliente. Se las acondiciona en frascos o potes de vidrio con tapa metálica o sobres pequeños que contengan 1 ó 2 gramos de la sustancia.

**Líquidos no acuosos:** tales como vaselina, aceites, glicerina y otros. Se los debe esterilizar exclusivamente por calor seco a 160-165°C. Se los acondiciona en pequeños volúmenes de no más de 30 gramos contenido en potes de vidrio con tapa metálica.

**Gasas vaselinadas:** se esterilizan exclusivamente por calor seco a 160°C; se las debe acondicionar en capas delgadas de no más de 13 a 15 mm de espesor, en cajas metálicas con tapa y se las sobreprotege con dos hojas de papel.

**Otros materiales:** Se realizara el acondicionamiento de los mismos tomando presente su resistencia a las temperaturas de esterilización.

### 5.2.6. Rotulado

Todo paquete debe tener un rotulado y control de exposición. El rotulado debe ser claro, fácil de interpretar y conocido por los usuarios.

Puede ser:

- Manual (sobre etiquetas autoadhesivas o sobre el doblado o pestaña del envoltorio).
- Mecánico (máquinas o plantillas).

El material debe estar identificado con los siguientes datos, de los cuales al menos los tres primeros son obligatorios:

- Identificación del material.
- Fecha de esterilización y/o validez del producto.
- Identificación del responsable (Código, nombre o iniciales)
- Destino (en el caso que hiciera falta).
- Número de lote. (en caso de poseer)
- Cualquier otra aclaración considerada necesaria.

### **5.2.7. Esterilización**

La selección del método de esterilización, se realiza de acuerdo al tipo de material a esterilizar.

Los métodos de esterilización pueden ser:

- Calor Seco.
- Calor Húmedo.
- Oxido de Etileno.
- Plasma de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Vapor de formaldehído.

Todo material resistente al calor, compatible con humedad debe ser autoclavado. Este es el principal método de esterilización.

Todo material resistente al calor, incompatible con humedad debe ser esterilizado por calor seco.

La esterilización por métodos químicos gaseosos, deben realizarse en cámaras con ciclos automatizados.

### **5.2.8. Conservación del material esterilizado**

El material estéril debe ser almacenado en condiciones que aseguren su esterilidad. La vida útil va a depender de la: manipulación, transporte, almacenamiento y uso correcto.

*Manipulación:*

- Una vez que el material sale del esterilizador se debe dejar enfriar para evitar condensados.
- Si se esterilizó con vapor se debe dejar secar en estufa a 37°C.

*Transporte:*

- El material se debe colocar en carros, canastos o contenedores.

### *Almacenamiento:*

- La zona de almacenamiento debe estar separada de otros materiales.
- Los contenedores o paquetes se colocan dentro de armarios cerrados o abiertos, higiénicos, frescos y secos.
- Se debe evitar la manipulación de los materiales ya estériles.
- Los materiales deben almacenarse a no menos de 30 cm del piso a 45 cm del techo y a un mínimo de 5 cm de las paredes.
- Se debe evitar aplastar los paquetes al ser almacenados.

### **Duración del material esterilizado**

Se acepta universalmente que la validez de la esterilidad está condicionada a los eventos a los que el material está expuesto.

En 1993 AAMI (*Association for Advancement of Medical Instrumentation*) estableció que:

- “La vida en estante de un material estéril dependerá de los eventos, de la calidad de los envoltorios, de las condiciones de almacenamiento, de las condiciones de transporte y de la cantidad de manipuleos.”
- “Un producto no estará estéril si el envoltorio está abierto, dañado, o húmedo”.

Por otro lado existen estudios que han demostrado que materiales correctamente almacenados se conservan estériles indefinidamente.

## **Practica de laboratorio N° 5**

### **ACONDICIONAMIENTO DE MATERIALES PARA SU ESTERILIZACIÓN**

#### **Consignas**

Cada alumno deberá preparar y acondicionar para su posterior esterilización los siguientes materiales:

- Materiales de vidrio: cajas de Petri, tubos de ensayos (con tapón de algodón, tapas a rosca y tapas de plástico), pipetas, jeringas, frascos (con tapa a rosca, tapa de goma), embudos, probetas, etc.
- Materiales de plástico y de goma.
- Medios de cultivos.
- Soluciones termoestables: contenidas en erlenmeyer, tubos de ensayo, frascos o botellas.
- Líquidos no acuosos: vaselina, aceite, etc., contenidos en frascos o botellas.
- Sustancias pulverulentas y cristalizadas: talco etc., en diversos envases.
- Hisopos.

#### **Materiales necesarios:**

- Algodón.
- Papel para envoltorio.
- Hilo de algodón, cinta adhesiva, bandita de goma.
- Marcador indeleble y/o bolígrafo.
- Gasas.
- Indicador o control de esterilización interno y externo.
- Etiquetas.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Gnass S.I., Andrade Stempliuk V. (2008). Manual de esterilización para centros de salud. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C.
- Huys J. (2015). El ciclo del producto sanitario estéril: Limpieza. World Federation For Hospital Sterilization Sciences. Updated: 09 May 2015.  
[http://www.deconidi.ie/html/educ/sbasics/sbasics0102\\_es.htm](http://www.deconidi.ie/html/educ/sbasics/sbasics0102_es.htm)
- Medvedeff, M.G., Bargardi, S, Jerke, G; Horianski, M.A.; Amer, L. (2006) Guía de Trabajos Prácticos. Catedra de Microbiología e Inmunología. 1° Parte. Editorial Universitaria de UNaM. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones.
- Ministerio de Salud Pública de la Nación (2004). *Guía de procedimientos y métodos de esterilización y desinfección para establecimientos de salud*. Dirección de calidad de los servicios de la Salud. Programa de Nacional de la Garantía de la Calidad de la atención médica. Resolución 387/2004.
- Robilotti S., Couso A. (2004). Preparación de materiales envoltorios y métodos. Esterilización Hospitalaria. CODEINEP. Buenos Aires.  
<http://www.codeinep.org/preparaciondematerialesenvoltoriosymetodos1.htm>.

---

*Profesoras responsables, 1° edición 2006: Dra Jerke Gladis, Dra Horianski Marta A.*

*Profesora responsable, 2° edición 2019: Dra Horianski Marta A.*

## Trabajo Practico N° 6

### MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN.

#### OBJETIVOS

- Comprender los conceptos de esterilización, desinfección y sanitización.
- Conocer los principales métodos de esterilización empleados en microbiología
- Diferenciar el agente esterilizante y la fundamentación fisicoquímica de los diversos métodos de esterilización
- Adiestrar al alumno en los métodos de esterilización por calor húmedo y seco.
- Adquirir habilidad en la selección del método de esterilización adecuado al material a esterilizar.
- Desarrollar destreza en el manejo de los equipos de esterilización: Autoclave y Estufa.

#### INTRODUCCIÓN

La esterilización es un término absoluto que implica la pérdida de viabilidad o la eliminación de todos los microorganismos contenidos en un objeto o sustancia, o su separación de acuerdo al método empleado.

Comprende un término absoluto debido a que un objeto está estéril o no, pero no puede estar parcialmente estéril.

Se entiende por pérdida de viabilidad a la pérdida irreversible de la capacidad de reproducción, sin que esto signifique necesariamente la destrucción o desaparición de la totalidad de las estructuras microbianas o de productos tóxicos derivados de estas.

Eliminación, se refiere a la separación de las estructuras microbianas presentes en un fluido, por ejemplo por filtración. Tampoco en este caso, se eliminan los productos metabólicos que son filtrables.

#### Definiciones

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), de acuerdo a la Disposición N° 6727/2003 y aprobado por Resolución Mercosur N° 28/2003 dispone en el presente reglamento las siguientes definiciones:

Desinfectante: es un producto que mata todos los microorganismos patógenos pero no necesariamente todas las formas microbianas esporuladas en objetos y superficies inanimados. (Res. GMC N° 26/96).

Sanitizante: es el agente/producto que reduce el número de bacterias a niveles seguros de acuerdo a normas de salud. (Res. GMC N° 26/96).

Desodorizante: producto que tiene en su composición sustancias con actividad antimicrobiana, capaz de controlar olores desagradables. (Res. GMC N° 26/96).

Esterilizante: es un producto usado con la finalidad de destruir todas las formas de vida microbiana, incluyendo las esporas bacterianas (Res. GMC N° 26/96).

Fungicida: es un producto letal para todas las formas de hongos (Res. GMC N° 26/96).

Germicida: es un producto de acción letal sobre los microorganismos, especialmente los patógenos (gérmenes) (Res. GMC N° 26/96).

Sufijo "cida": indica que la acción antimicrobiana es la muerte de los microorganismos a los que se refiere, por ejemplo: germicida, microbicida, bactericida, fungicida, etc.

Sufijo "stático" / prefijo "anti": indica que la acción antimicrobiana se limita a la inhibición del crecimiento (multiplicación) del microorganismo sin llegar necesariamente a producirse la muerte del mismo, ejemplos: bacteriostático, fungistático, etc.

Esporicida: producto letal para las formas esporuladas de bacterias.

Es importante tener claro el concepto de esterilización.

Antiséptico: agente que controla y reduce la presencia de microorganismos potencialmente patógenos sobre piel y/o mucosas (sólo pueden aplicarse externamente sobre seres vivos).

## **6.1. SELECCIÓN DEL MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN**

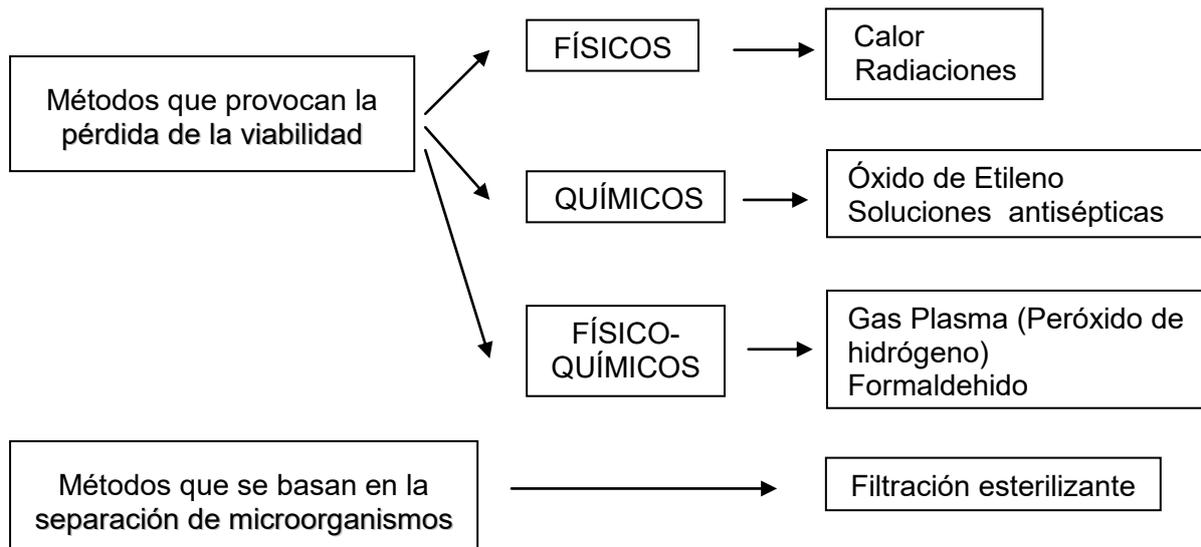
Para lograr la esterilización de un material determinado, se cuenta con varios métodos de esterilización, basados en diferentes mecanismos de acción y que emplean diversos agentes esterilizantes. Los factores que determinan la elección del método de esterilización son:

- 1- Sensibilidad del material al agente esterilizante
- 2- Penetrabilidad del agente en el material a esterilizar
- 3- Presentación del material (volumen total o fraccionado)
- 4- Uso posterior del material

A excepción de la filtración esterilizante, que se basa en la separación física de los microorganismos contenidos en un fluido, todos los demás provocan *in situ* la pérdida irreversible de la capacidad de reproducción de los microorganismos expuestos. En estos casos, salvo excepciones, los productos de degradación permanecen asociados al objeto o sustancia ahora estéril.

## **6.2. CLASIFICACION DE METODOS DE ESTERILIZACIÓN**

Los métodos de esterilización se pueden clasificar en físicos, químicos y físico-químicos (Figura 1). Se considera como el agente esterilizante ideal aquel que consigue una acción bactericida, esporicida, tuberculicida, fungicida y viricida; actúa en el menor tiempo posible y posee alto poder de penetración (Ahel, 2013).



**Figura 6.1.** Clasificación de los métodos de esterilización. (Jerke, 2003)

### 6.3. MÉTODOS FÍSICOS QUE PROVOCAN LA PÉRDIDA DE VIABILIDAD: CALOR

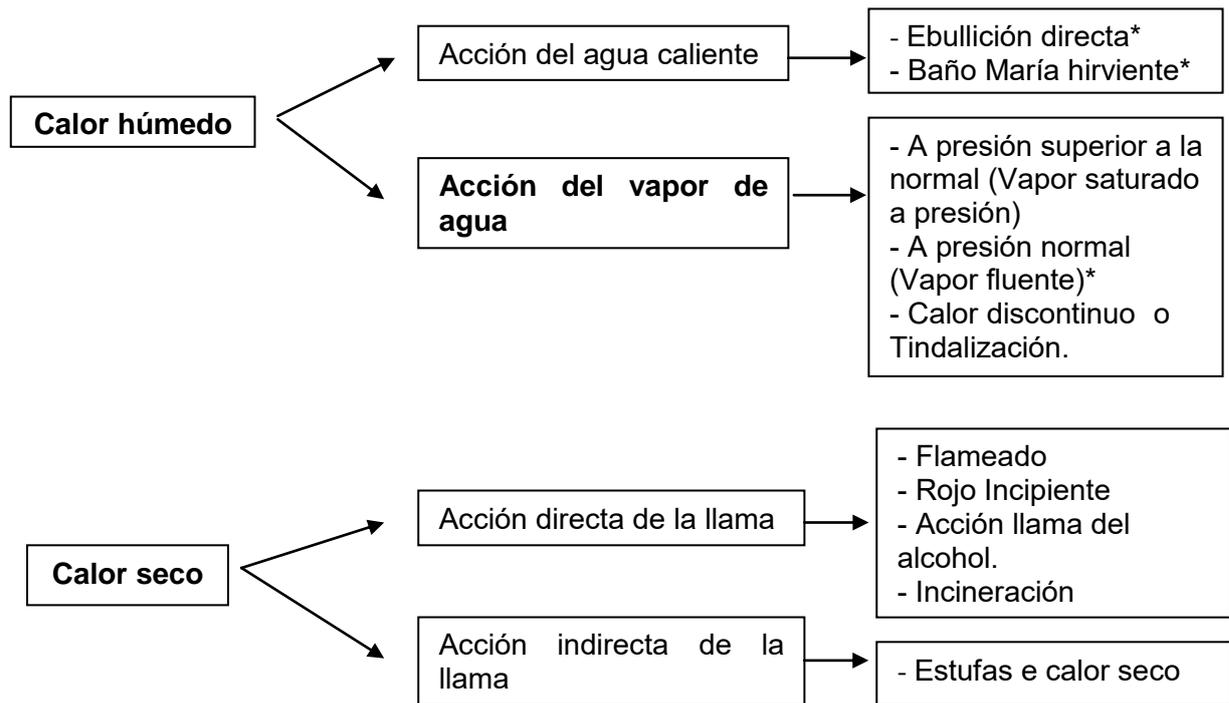
Entre los métodos que provocan la pérdida de viabilidad (figura 6.1), son más utilizados los métodos físicos y los fisicoquímicos. Aunque la utilización de uno u otro tipo de método, dependerá de los factores ya mencionados en el apartado 6.1.

Todos los microorganismos son susceptibles, en distinto grado, a la acción del calor. La mayoría de los hongos, y las células vegetativas de varias bacterias patógenas, pierden la capacidad de reproducirse en unos pocos minutos a temperaturas entre 50-70°C, y los esporos de varios agentes patógenos a 100°C.

Los métodos que se basan en la aplicación del calor como agente esterilizante son preferidos y aplicables a la mayoría de los materiales. Estos métodos abarcan el empleo de calor húmedo y calor seco (Figura 6.2). La utilización de este método y su eficacia depende de dos factores:

- Tiempo de exposición
- Temperatura

El calor provoca diferentes tipos de procesos celulares que inciden en distinto grado sobre la pérdida de viabilidad, según el método empleado (calor seco o calor húmedo). Dentro de estos procesos celulares se pueden nombrar: desnaturalización de proteínas, fusión y desorganización de las membranas y/o procesos oxidantes irreversibles en los microorganismos.

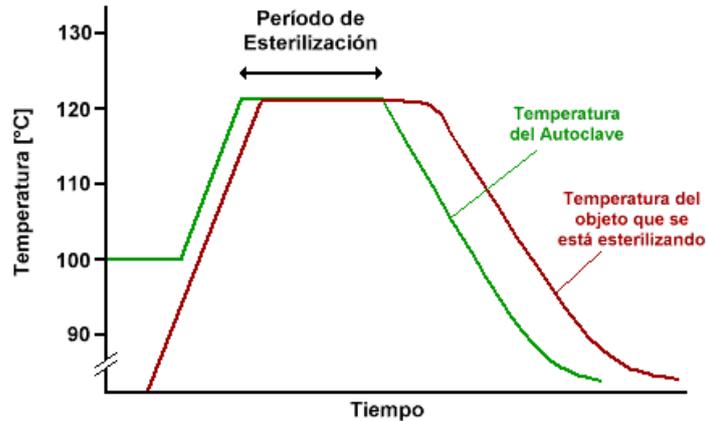


**Figura 6.2.** Métodos habituales de esterilización por calor húmedo y seco. (Jerke, 2003)

*\* Es imprescindible tener claro que los métodos incluidos en el cuadro como ebullición directa, baño María hirviente y acción del vapor de agua a presión normal son difícilmente controlables y de muy baja eficiencia. Sólo deben ser usados cuando no puede ser aplicado otro método o, como excepción en caso de emergencia.*

Vale la pena destacar que un producto se considera estéril cuando la probabilidad de encontrar unidades contaminadas es menor o igual a  $10^{-6}$ , esto es una unidad contaminada cada millón de unidades idénticas procesadas. A mayor número de microorganismos y/o resistencia de la población se necesitará mayor tiempo de esterilización.

Durante el proceso de esterilización por calor debe tenerse en cuenta que el tiempo de esterilización comienza cuando se ha alcanzado la temperatura óptima en el interior del equipo (ya sea autoclave, por calor húmedo ó estufa, por calor seco). Generalmente el material a esterilizar puede requerir tiempos más largos para alcanzar la temperatura de esterilización, al igual que para liberar (perder) esa temperatura (Figura 6.3).



**Figura 3.** Proceso de esterilización por calor. Diferencias entre la temperatura del equipo de esterilización y del material a ser esterilizado.

### 6.3.1. ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO

#### → Acción del vapor de agua a presión superior a la normal

Agente esterilizante: vapor de agua saturado a presión superior a la normal.

Mecanismo de acción: el principal mecanismo responsable de la muerte microbiana es la coagulación de proteínas como consecuencia de la liberación de energía (de 540 cal/g), por acción del vapor de agua saturado. Esta energía liberada durante la condensación provoca que los materiales húmedos conduzcan el calor mucho más rápido que los materiales secos.

Para lograr una esterilización confiable, el método estándar es el vapor saturado en autoclave, a temperatura de 121°C durante no menos 15 minutos. Esta temperatura se logra por vapor de agua a 1 atmósfera de presión sobre la atmosférica. Sirve para destruir todos los microorganismos, incluyendo los organismos formadores de esporas.

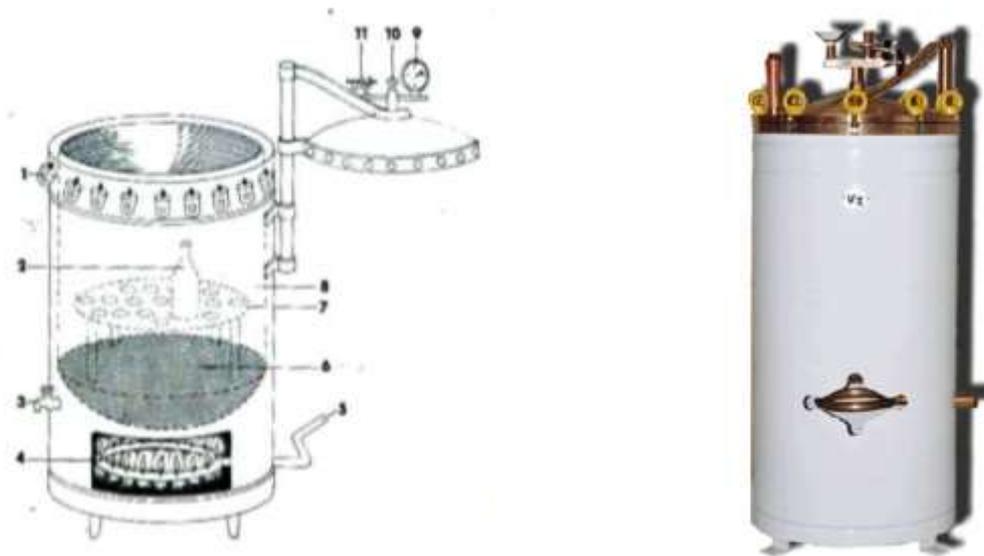
El **autoclave** es el aparato más comúnmente utilizado en los laboratorios para esterilizar medios de cultivo y soluciones que no formen emulsiones con el agua y que no se desnaturalicen a temperaturas mayores a 100°C (aceites, vaselina). También puede ser utilizado para esterilizar material de vidrio, material textil y elementos tubulares bajo ciertas recomendaciones. Las precauciones que hay que tener cuando es utilizado para esterilizar material de vidrio, es que éste luego debe ser secadas en estufa. Sólo si el autoclave esté provisto de un sistema de secado por vacío, va a poder utilizarse para esterilizar material textil. Finalmente, cuando se desea esterilizar elementos tubulares (como por ejemplo los tubos o manguera de un respirador artificial) conviene humedecerlos con agua destilada, para que el vapor generado expulse el aire que pueda depositarse en su interior.

Precauciones: el vapor de agua es un agente esterilizante de superficie, de modo que establece su acción sólo sobre ésta. Por lo que las mismas se deberán exponer libres a la

acción del agente esterilizante permitiendo su pasaje, como por ejemplo: pinzas abiertas, jeringas desensambladas, entre otras.

El *autoclave de Chamberland* consta de una caldera de cobre sostenida por una camisa externa metálica, que en la parte inferior recibe calor por combustión de gas, ésta se cierra por la parte superior por una tapa de bronce. Esta tapa posee 3 orificios, uno para el manómetro, otro para el escape de vapor en forma de robinete y el tercero para la válvula de seguridad que funciona como contrapeso o por resorte (Figura 6.4).

En el uso del autoclave es muy importante, permitir que el vapor de agua desplace en forma total el aire de la cámara de esterilización antes de que la presión aumente. De no ser así, la presión resultante será la suma de las presiones parciales del aire y del vapor de agua, y por lo tanto la temperatura resultante será tanto menor cuanto mayor proporción de aire contenga la cámara.



**Figura 6.4.** Diagrama de un autoclave de Chamberland simple. 1- Tornillos móviles. 2-Material que debe ser esterilizado. 3- Canilla de desagote de la caldera. 4- Fuente de calor. 5- Entrada de gas. 6- Fondo cóncavo con agua. 7- Falso fondo: sirve de apoyo para alejar los elementos del agua. 8- Caldera. 9- Manómetro. 10- Espita. 11- Válvula de seguridad.

Condiciones del proceso: Las condiciones de esterilización por calor húmedo en autoclave de Chamberland a tener en cuenta son temperatura y tiempo (Tabla 1).

**Tabla 1.** Condiciones de esterilización a considerar en autoclave de Chamberland.

Temperatura (°C)	Tiempo de exposición mínimo (minutos)
121	15
126	10
134	7

Durante el proceso de esterilización por calor húmedo es muy importante la influencia de la descarga completa de aire del interior del autoclave para lograr alcanzar la temperatura de esterilización correcta. La Tabla 2 correlaciona la temperatura alcanzada con respecto a la incompleta descarga de aire en el autoclave.

**Tabla 2.** Correlación entre la presión del interior del autoclave con la descarga incompleta del aire.

Presión (atm.)	Temperatura (°C)			
	Descarga completa del aire	Descarga de 2/3 del aire	Descarga de 1/2 del aire	Sin descarga del aire
1/3	109	100	90	72
2/3	115	109	100	90
<b>1</b>	<b>121</b>	<b>115</b>	<b>109</b>	<b>100</b>
4/3	126	121	115	109
5/3	130	126	121	115
2	133	130	126	121

#### Ventajas del calor húmedo

- Rápido calentamiento y penetración
- Destrucción de bacterias y esporas en corto tiempo
- Bajo deterioro del material expuesto (por < temperatura y < tiempo)
- No deja residuos tóxicos
- Económico

#### Desventajas del calor húmedo

- No permite esterilizar soluciones que formen emulsiones con el agua (grasas, polvos)
- No apto para aplicar en materiales termolábiles
- Es corrosivo sobre ciertos instrumentos metálicos.

En la Tabla 6.3 se enumeran los materiales que se pueden y no se pueden esterilizar con calor húmedo en autoclave de Chamberland.

**Tabla 6.3.** Materiales esterilizables y no esterilizables por calor húmedo.

Materiales esterilizables con calor húmedo	Materiales no esterilizables con calor húmedo
Material textil	Sustancias oleosas
Material de vidrio	Sustancias grasas
Material de goma	Polvos
Instrumental quirúrgico de acero inoxidable	Instrumental quirúrgico cromado o niquelado
Soluciones acuosas	Artículos eléctricos sin cobertura especial

### → Vapor fluente

En este método se emplea como agente esterilizante el vapor de agua, aplicando temperatura de ebullición, a presión normal.

Consiste en someter el material a esterilizar a la acción del vapor del agua a presión atmosférica (o sea vapor saturado a 100°C). Esta es una técnica útil para tratar sustancias que no admiten calentamientos superiores a 100°C sin perder alguna de sus propiedades. Se aplica corrientemente para esterilizar medios de cultivos que pueden sufrir modificaciones en su composición si sobrepasan una temperatura mayor a 100°C (Por ejemplo: medios de cultivo con gran contenido de glucosa, donde la misma se puede caramelizar a temperaturas superiores a los 100°C).

Para aplicar esta técnica, se coloca el material, adecuadamente preparado, en el interior de un autoclave y se procede al calentamiento, dejando la espita abierta. El tiempo se computa desde que comienza a escapar vapor. El tiempo de calentamiento va a depender del material a tratar y su grado de contaminación, pero generalmente debe ser superior al utilizado con vapor saturado a presión superior a la normal.

### → Tindalización

Esta técnica se emplea cuando se desea esterilizar sustancias que se descomponen o se alteran a ciertas temperaturas, como el caso de soluciones albuminosas, azucaradas, sueros sanguíneos, componentes de medios de cultivo celulares, entre otras.

Se coloca el material en recipientes adecuados, se calienta a baño María a una temperatura que varía entre 55 y 100°C, durante 1 hora. Se deja enfriar y se mantiene a la temperatura ambiente, durante 24 horas. Luego se repite el calentamiento al cabo de este lapso de tiempo y a través de las 48 horas.

Este proceso implica gran número de calentamientos, debido a la menor temperatura utilizada en el proceso. Durante el primer calentamiento se destruyen solamente las formas vegetativas, quedando con vida los esporos, que se desarrollan luego. En los posteriores calentamientos, las formas vegetativas por ellos producidos son las que se destruyen.

### → Pasteurización

El principio general de la pasteurización es la destrucción selectiva de la población patógena microbiana, sensible al calor que se encuentra en la leche y otros alimentos.

Consiste en mantener la leche o los alimentos en recipientes a 63°C, durante 30 minutos y luego inmediatamente refrigerarlos.

La pasteurización elimina todos los gérmenes patógenos, no esporulados, pero deja microorganismos sobrevivientes que producirán alteración del producto pasteurizado (ej. leche) si no se la refrigera adecuadamente. Los microorganismos que permanecen en el producto,

serán los responsables de la obtención de los subproductos fermentados. En el caso de la leche: Yoghurt, quesos.

*Este método no “esteriliza”, sino que reduce la carga microbiana no afectando las propiedades del material. Es un método de desinfección sanitizante. Elimina los patógenos, sana.*

### 6.3.2. ESTERILIZACIÓN POR CALOR SECO

El calor seco produce procesos oxidativos y fusión de membranas por sobre la desnaturalización proteica. Estos efectos se deben a la transferencia de calor desde los materiales a los microorganismos que están en contacto con éstos. La acción destructiva del calor sobre proteínas y lípidos requiere mayor temperatura cuando el material está seco o la actividad del agua del medio es baja.

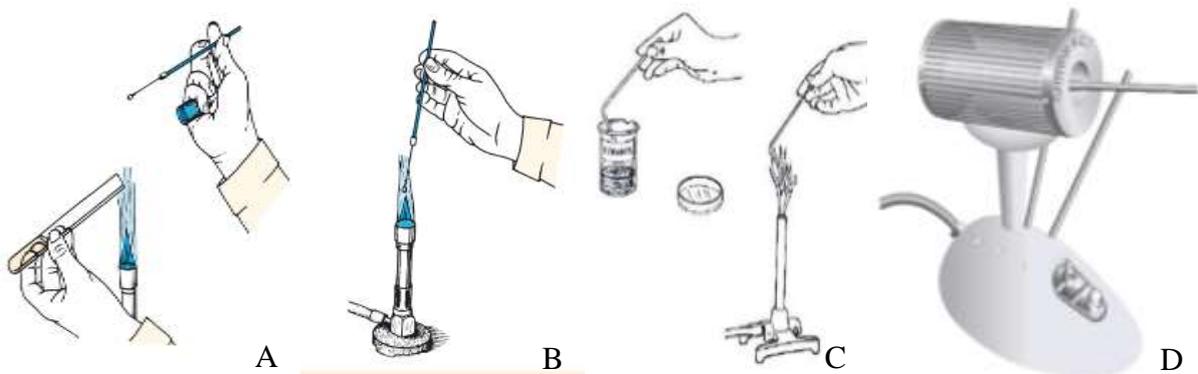
#### → Por acción directa de la llama

Flameado: se aprovecha la llama de un mechero de Bunsen. Se usa para varillas y planchas de vidrio, espátulas, bocas de recipientes de vidrio, entre otros. Este procedimiento no es un método real de esterilización, sino que reduce la probabilidad de contaminación ambiental (Figura 6.5.A).

Rojo incipiente: consiste en calentar directamente a la llama, llevando hasta rojo incipiente y manteniendo unos segundos en este estado. Se utiliza para ansas de platino, lancetas, agujas de disección, entre otros (Figura 6.5.B).

Acción de la llama del alcohol: se vierte una cantidad apropiada de alcohol que permita, al encenderlo que su llama alcance toda la superficie a esterilizar durante varios minutos. Se utiliza para morteros, materiales de vidrio, cirugía, entre otros (Figura 6.5.C).

Incineración: Es necesario disponer del equipo incinerador para poder ser utilizado. No es de uso habitual en laboratorios de microbiología corrientes. (Figura 6.5.D).



**Figura 6.5.** Métodos de esterilización por acción directa de la llama. A- Flameado de la boca de tubos de ensayo. B- Rojo incipiente de un ansa. C- Acción de la llama del alcohol. D- Incinerador

### → Por acción del sobrecalentamiento del aire

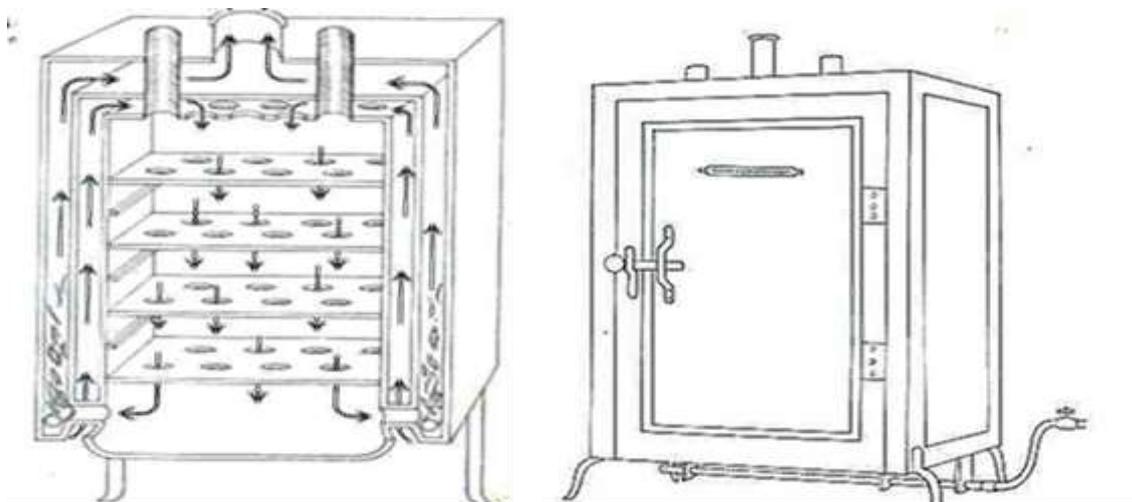
Agente esterilizante: aire caliente seco.

Mecanismo de acción: la muerte del microorganismo se produce como consecuencia de la liberación de energía, siendo uno de los mecanismos la oxidación degradativa.

Precauciones: dado que el aire es un mal conductor del calor, es necesario extremar los cuidados en la preparación del material. El mismo debe estar limpio, libre de materia orgánica, grasa o aceites que aíslan los microorganismos.

Parámetros para tener en cuenta: estos parámetros variarán de acuerdo a la carga, volumen, peso, resistencia térmica del material, tipo y potencia de la estufa

- Temperatura. Las temperaturas de esterilización fluctúan entre 160°C a 180°C. La temperatura empleada no deberá estar por debajo de los 160°C durante 2 h, pues es la mínima condición, cuando el tenor de agua es de 0%. Tampoco deberán usarse temperaturas superiores a las establecidas, (por encima de 180°C), ya que el material sufriría serios deterioros.
- Tiempo. Para definir los tiempos de todo el ciclo se considera:
  1. El tiempo que necesita el aire dentro de la cámara para alcanzar la temperatura de esterilización (tiempo de precalentamiento).
  2. El tiempo que tarda los materiales en alcanzar la temperatura de esterilización.
  3. El tiempo de esterilización propiamente dicho.
- Equipos. Estufas eléctricas u hornos son utilizados para este fin (Figura 6). El agente esterilizante es el aire caliente seco. Este proceso de esterilización requiere mayor temperatura y tiempo que en el caso del vapor saturado, ya que tiene una menor capacidad para tomar, transportar y ceder calor. El calor penetra a través de cualquier "materia" sea cual fuese ella, atravesándola y se dirige desde los puntos de mayor temperatura a los de menor temperatura hasta igualarse la misma en todos los puntos.



**Figura 6.** Diagrama esquemático de una estufa de esterilización.

La estufa presenta una doble cámara, el aire caliente generado por una resistencia circula por la cavidad principal y por el espacio entre ambas cámaras. Se mantiene una temperatura estable mediante termostatos de metal, que al dilatarse por el calor cortan el circuito eléctrico (Figura 6).

Con el fin de obtener un correcto proceso de esterilización debe permitirse que la convección del aire dentro de la estufa fluya correctamente, no colocando grandes paquetes de material que obstruyan su circulación.

El papel y el algodón, así como el material acondicionado con estos elementos, no deben esterilizarse a más de 160°C dado que se carbonizan.

*Bajo ningún concepto debe abrirse la puerta de la estufa durante el proceso de esterilización, pues se producen disminuciones de temperaturas de hasta 25°C en el interior de la cámara y de hasta 40°C en el interior del material a esterilizar. Esto afecta el correcto proceso de esterilización.*

#### Ventajas del calor seco

- No es corrosivo para metales e instrumentos.
- Permite la esterilización de sustancias en polvo, viscosas, no acuosas. (No volátiles).

#### Desventajas del calor seco

- Requiere mayor tiempo de esterilización, respecto al calor húmedo, debido a la baja penetración del calor.

En la Tabla 6.4 se enumeran los materiales que se pueden y no se pueden esterilizar con calor seco.

**Tabla 4.** Materiales esterilizables y no esterilizables por calor seco.

<b>Materiales que pueden esterilizarse</b>	<b>Materiales que no pueden esterilizarse</b>
Instrumental cromado	Material textil
Objetos de vidrio, aluminio, porcelana	Materiales sintéticos y gomas
Compuestos minerales termoestables en forma de polvos (talco, bórax, etc.)*	Instrumental óptico, eléctrico
Vaselina, parafina, sustancias grasas, aceites*	Materiales sensibles altas temperaturas

\* Respecto a las sustancias grasas y pulverulentas es importante señalar que las mismas deben acondicionarse en volúmenes pequeños, para asegurar que el calor penetre en toda la masa del material a esterilizar ya que son malos conductores térmicos.

### 6.3.3. RADIACIONES

Las radiaciones son métodos de esterilización físicos que provocan la pérdida de viabilidad microbiana. La acción de las radiaciones como métodos físicos que depende de:

1. Tipo de radiación
2. Tiempo de exposición
3. Dosis

▪ Radiaciones ionizantes: producen iones y radicales libres que alteran las bases de los ácidos nucleicos, estructuras proteicas y lipídicas, y componentes esenciales para la viabilidad de los microorganismos. Las más utilizadas son los rayos gamma por su gran penetrabilidad. Para su utilización, se requiere de instalaciones complejas y costosas, por lo que se utilizan generalmente a escala industrial (antibióticos, vacunas, alimentos, entre otros). Además se emplean para esterilizar materiales termolábiles como jeringas descartables, sondas, agujas, prótesis, catéteres, entre otros. No son utilizadas para medios de cultivos o soluciones proteicas porque se producen alteraciones en sus componentes.

▪ Rayos ultravioletas: Este método inactiva a los microorganismos en los rangos 240 – 280 nm. Su acción se ejerce por desnaturalización de los ácidos nucleicos, interfiere en las uniones covalentes entre residuos adyacentes de pirimidinas, formando dímeros. Estos distorsionan la forma del ADN e interfieren en el apareamiento normal de las bases, dando como resultado inhibición de la síntesis de ADN y por lo tanto inhibición del crecimiento y la respiración.

Su efectividad se ve influenciada por factores como la potencia de los tubos UV, presencia de materia orgánica, longitud de la onda, temperatura y tipo de microorganismos. La radiación ultravioleta puede producirse artificialmente con lámparas de vapor de mercurio.

Son escasamente penetrantes y se utilizan en el control de infecciones llevadas por el aire, por ejemplo, esterilización de cabinas de flujo laminar, de superficie, de quirófanos, entre otros. La radiación UV no desinfecta ni esteriliza el agua.

### 6.4. MÉTODOS QUÍMICOS QUE PROVOCAN LA PÉRDIDA DE VIABILIDAD

Entre los métodos que provocan la pérdida de viabilidad, se ubican los agentes químicos, líquidos o gaseosos. Cuando los materiales a esterilizar no pueden someterse a procesos de esterilización que emplean altas temperaturas, se puede emplear la esterilización química. Como métodos químicos de esterilización generalmente se utilizan agentes alquilantes. Éstos reemplazan a los átomos de hidrógeno lábiles de los grupos amino, hidroxilos, formando uniones de alta energía que llevan a la pérdida de las actividades biológicas de las moléculas con las que se combinan y provocan la pérdida de viabilidad de los microorganismos. Son activos tanto para esporos como para células vegetativas.

Las variables de esterilización por agentes químicos dependen de:

1. Concentración del agente
2. Temperatura del proceso
3. Tiempo de exposición
4. Humedad
5. Presión

:

#### **6.4.1. AGENTES GASEOSOS: ÓXIDO DE ETILENO**

El óxido de etileno es un agente alquilante que se ha convertido en uno de los métodos de esterilización química más utilizados. Este método se utilizará sólo cuando no se pueda aplicar altas temperaturas y además los materiales lo permitan.

Agente esterilizante: es un gas sumamente explosivo cuando se mezcla con el aire. Es una sustancia altamente reactiva; con agua forma etilenglicol.

Mecanismo de acción: actúa por alquilación de las proteínas constituyentes de las membranas microbianas.

Equipos. Se recomienda el esterilizador por óxido de etileno, que permita la realización de un ciclo completo (esterilización / desgasificación) dentro de una misma cámara. El equipo debe tener:

- Un panel de control para medir presión, temperatura y tiempo del proceso.
- Estará equipado con sistemas de ventilación y desgasificación de los materiales.
- El funcionamiento será a presión negativa, para seguridad global del personal.
- Deberá estar equipado con un dispositivo de calentamiento y humidificación, como así también con un sistema de seguridad en su cierre.

Cuando se emplea este método se debe determinar cuidadosamente el tiempo de exposición a emplear ya que éste depende de la temperatura, humedad, concentración del gas, la permeabilidad del material que recubre los instrumentos a esterilizar y el tipo de microorganismo a eliminar. Generalmente un período completo de esterilización tarda varias horas.

Efectos adversos: Este gas es inflamable, explosivo y carcinogénico, por lo que todos los trabajadores deben protegerse de la exposición al mismo ya que es muy tóxico para la piel, ojos y mucosas. Produce irritación de mucosas, manifestaciones gastrointestinales (náuseas, vómitos); otras más severas: -disnea, cianosis, migrañas, somnolencia, prurito, hemólisis, aberraciones cromosómicas, teratogenicidad y carcinogenicidad.

Debido a estos efectos adversos, se lo considera como una sustancia altamente peligrosa y de uso restringido a profesionales debidamente capacitados y en instituciones habilitadas.

#### **6.4.1. AGENTES LIQUIDOS:**

##### **SOLUCIONES ANTISEPTICAS**

Aldehídos: son agentes alquilantes que actúan sobre las proteínas, provocando una modificación irreversible en ellas, inhibiendo la actividad enzimática. Estos compuestos destruyen las esporas.

Glutaraldehído: Es un potente bactericida. Es un compuesto estable sin riesgo de polimerización. Se utiliza como desinfectante en frío, en forma alcalina (0.1 al 2% mezclado con agua). Puede esterilizar plástico, goma, vidrio, metal, entre otros.

Para la esterilización se debe seguir el siguiente procedimiento:

- Limpiar y secar el material a esterilizar.
- Sumergir el material en la solución de Glutaraldehído al 2% durante 10 horas. Se debe asegurar que todas las superficies estén en contacto con la solución.
- Enjuagar con abundante agua estéril.

Este agente tiene como ventajas que no es corrosivo y prácticamente no tiene ningún efecto dañino para los instrumentos, mantiene su actividad aun en presencia de materia orgánica. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el glutaraldehído puede resultar irritante para los trabajadores y que las soluciones diluidas al 2% pierden su efectividad aproximadamente en dos semanas (a menos que el proveedor indique lo contrario).

Ácido peracético: Es un agente oxidante que mantiene su eficacia en presencia de materia orgánica. La esterilización con este agente tiene como ventajas que incluye ciclos de esterilización relativamente cortos, el material se puede utilizar inmediatamente y el ácido se puede eliminar directamente a los sitios de drenaje. Sin embargo, tiene como desventajas que es sumamente corrosivo y el material se debe enjuagar con agua destilada estéril después del proceso.

#### **6.5. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS QUE PROVOCAN LA PÉRDIDA DE VIABILIDAD**

Esterilización por gas-plasma de peróxido de hidrógeno: Es un proceso rápido (45 – 75 min.) a baja temperatura que se basa en la acción de peróxido de hidrógeno en fase plasma, que ejerce la acción biosida. Es una alternativa a la esterilización por óxido de etileno para materiales termolábiles, ya que este proceso se realiza a baja temperatura (por debajo de los 40°C) y baja humedad.

Para que la esterilización se lleve a cabo, el material debe estar perfectamente limpio y seco, dado que la presencia de materia orgánica y humedad detienen el ciclo; y debe envolverse en envoltorios especiales de polipropileno.

Formaldehído: Se utiliza como desinfectante o esterilizante en forma líquida o gaseosa, cuando todos los demás métodos de esterilización no pueden aplicarse. Se utilizan las pastillas de formaldehído, las cuales pueden disponerse en el fondo de una caja envueltas en gasas o

algodón, que después pueden ser expuestas al calor para una rápida esterilización (acción del gas formaldehído). También pueden ser utilizadas en estufas de formol, que son cajas de doble fondo, en donde se colocan las pastillas y se calienta hasta 60°C. Pueden esterilizar materiales de látex, goma, plásticos, entre otros.

Las pastillas de formalina a temperatura ambiente esterilizan en 36 h.

## 6.6. MÉTODOS QUE SE BASAN EN LA SEPARACIÓN DE MICROORGANISMOS

Filtración: se usan membranas filtrantes con poros de un tamaño determinado para esterilizar: emulsiones oleosas, algunos tipos de pomadas, soluciones termolábiles, intravenosas, antibióticas, vitaminas, drogas diagnósticas, medios para cultivos celulares, entre otras.

El tamaño del poro dependerá del uso al que se va a someter la muestra (Tabla 5). Las partículas mayores van a ser retenidas en la superficie, y las menores serán atrapadas en la matriz del filtro. Los filtros que se utilizan no retienen virus ni micoplasmas, ya que están en el límite de separación según el tamaño del poro de la membrana que se utilice.

**Tabla 6.5.** Relación entre la utilidad de la membrana filtrante y el tamaño del poro.

Diámetro del poro	Usos
0,1 – 0,2 $\mu\text{m}$	Filtración esterilizante
0,45 $\mu\text{m}$	Análisis de coliformes en agua
5 $\mu\text{m}$	Análisis de células en fluidos corporales

Existen tres tipos básicos de filtros:

- Filtros profundos o de profundidad: consisten en un material fibroso o granular prensado, plegado, activado o pegado dentro de los canales de flujo. En este tipo de filtro la retención de las partículas se produce por una combinación de absorción y de retención mecánica en la matriz.

- Membranas filtrantes: tienen una estructura continua, y la retención se debe principalmente al tamaño de la partícula. Partículas más pequeñas al tamaño del poro quedan retenidas en la matriz del filtro debido a efectos electrostáticos.

El tamaño de los poros de los filtros de membrana, compuestos por ésteres de celulosa biológicamente inerte varía entre 0,023  $\mu\text{m}$  a 14  $\mu\text{m}$ . En la filtración de líquidos, un gran número de partículas algo menores que el tamaño de los poros son retenidas por las fuerzas de van der Waals, por atrapamiento al azar en los poros y por suma de partículas retenidas previamente.

- Filtros de huella de nucleación (nucleoporo): son películas muy delgadas de policarbonato que son perforadas por un tratamiento conjunto con radiación y sustancias químicas. Son filtros con orificios muy regulares que atraviesan la membrana verticalmente. Funcionan como tamices, evitando el paso de toda partícula con tamaño mayor del poro.

## 6.7. CONTROLES DE ESTERILIDAD Y DE ESTERILIZACION

### 6.7.1. Control de esterilidad

Se realiza sobre muestras o alícuotas del material esterilizado, con el objeto de comprobar la total ausencia de microorganismos en el mismo. Permite comprobar en forma probabilística si el material quedó completamente esterilizado, puede ser que sea un porcentaje representativo de todo el material

Transferencia directa a medio de cultivo: se transfiere una parte de muestra a medios de cultivos apropiados que permitan el crecimiento de cualquier contaminante.

- Tioglicolato para anaerobios y aerobios 37°C.
- Trypticase-soja para aerobios 25°C.
- Agar papa dextrosa o Agar Sabouraud, para hongos 25°C

Filtración por membrana: se utiliza para determinar la esterilidad de medios de cultivos, soluciones de antibiótico, entre otros.

Se filtran los medios y se procesa el filtro como un control de esterilidad para determinar si hay microorganismos presentes.

### 6.7.2. Control de esterilización

Es el control que se realiza para comprobar si se cumplieron las condiciones del método empleado. Su objetivo es monitorear y controlar si el proceso de esterilización funciona correctamente. Existen distintos métodos de control de esterilización:

Métodos Físicos: Los controles físicos indican que las condiciones de esterilización son las adecuadas, es decir verifican que se cumplan los parámetros del ciclo de esterilización, pero no aseguran que los microorganismos hayan sido eliminados. Ejemplos de estos son:

- ✓ Medidores de presión
- ✓ Termómetros
- ✓ Termógrafos (T° y tiempo)

Permiten constatar las condiciones ambientales físicas dentro de la cámara de esterilización, y cuando se obtengan medidas inferiores a las óptimas, se supondrá una esterilización incorrecta.

Métodos Químicos: Los controles químicos llamados termocromos o indicadores colorimétricos, son dispositivos especiales impregnados de compuestos químicos principalmente a base de sales de diferentes metales, sensibles al cumplimiento de los parámetros de esterilización (tiempo, presión y temperatura). Estos controles deben ubicarse en la cámara, interior o exterior del paquete, viran de color si se cumplen los parámetros físicos del autoclave y se debe validar su “viraje” o cambio de color antes de usar el material.

Se clasifican en:

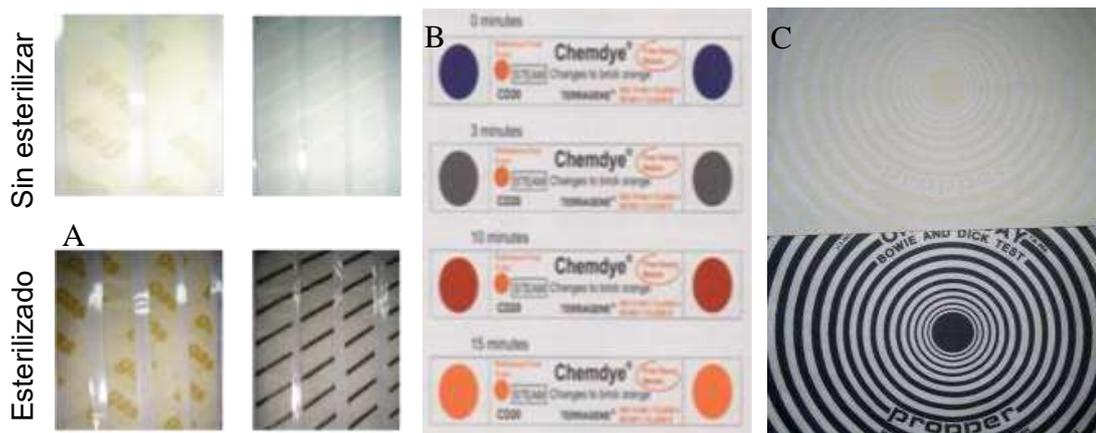
- Controles químicos externos: Son dispositivos de monitoreo que se deben colocar en la parte externa de la caja o paquete que se va esterilizar y demuestran que la unidad ha sido expuesta al proceso de esterilización a través de un cambio físico o químico que se observa y por lo tanto distingue material procesado de los no procesados (Figura 7).
- Controles químicos internos: Son dispositivos de monitoreo que se deben colocar en el interior de cada paquete que se va esterilizar en el área más crítica (Figura 7). Miden los siguientes parámetros críticos:
  - Autoclave: Vapor, Humedad, Presión y T°
  - Óxido de Etileno (OE): Concentración de OE, Presión y T°.

Se clasifican en:

- Uniparámetros: Miden solo una variables critica del proceso.
- Multiparámetros: Miden dos o más variables críticas
- Integradores: Están diseñados para reaccionar a todas las variables críticas.
- Bowie & Dick: Son dispositivos de monitoreo que se deben colocar en el interior del equipo de esterilización. Los paquetes de prueba contienen hojas de papel que actúan como barrera física, y entre medio de éstas se ubica la hoja laminada de indicador químico, impresa con tintas. Este control detecta la evacuación de aire y la eficaz penetración del vapor de agua en el paquete de prueba (Figura 7).

Resultados posibles:

- ✓ Un cambio de color uniforme de la tinta del color amarillo al negro en toda la hoja prueba la eficacia de la remoción de aire y la penetración del vapor.
- ✓ Un cambio de color heterogéneo o la falta de cambio de color pueden evidenciar la mala calidad del vapor, vapor sobrecalentado o la existencia de gases no condensables en el dispositivo de vapor. Los cambios de color no uniformes hacen necesario la evaluación del equipo esterilizador y una nueva prueba de Bowie & Dick.



**Figura 6.7.** Controles químicos de esterilización. **A-** Control químico externo, **B-** Control químico interno, **C-** Bowie & Dick.

Métodos Biológicos: Los controles biológicos son los únicos que garantizan la eliminación real de microorganismos. Son los controles de esterilización más recomendados por su seguridad y eficacia. Estos indicadores son preparaciones estandarizadas de esporas de microorganismos altamente resistentes al método de esterilización que se emplea. Estos indicadores se procesan en forma conjunta con el material a esterilizar.

Existen distintos tipos de indicadores biológicos y su utilidad va a depender del método de esterilización utilizado:

- Tiras con esporas: Tiras de papel impregnadas de esporas en envases individuales
- Autocontenidos: Ampollas con tiras o discos de papel inoculados de esporas y provistas de un medio de cultivo. Suspensiones de esporas en el propio caldo de cultivo. Suspensiones de esporas dosificadas para inocular los productos a esterilizar.
- Enzimáticos: Este control verifica la presencia o ausencia de esporas una vez terminada la carga de esterilización de material. Mediante este procedimiento los resultados son obtenidos en menor tiempo.

## **Practica de Laboratorio N°6 ESTERILIZACION POR CALOR HÚMEDO Y SECO**

Cada alumno clasificará el material a esterilizar según el método de esterilización y esterilizará por calor húmedo en autoclave y seco en estufa los materiales preparados y acondicionados durante la Practica de Laboratorio N°5:

- material de vidrio (cajas de Petri, tubos de ensayos, pipetas, jeringas, etc.).
- material de plástico, goma.
- medios de cultivos
- soluciones termoestables, Erlenmeyer con agua destilada
- líquidos no acuosos (frasco con vaselina, aceite, etc).
- sustancias pulverulentas y cristalizadas (frasco con talco) etc.
- Hisopos

### **Proceso de esterilización por autoclave:**

- 1- Verificar el estado general del equipo y limpieza interior.
- 2- Verificar el nivel del agua del autoclave, asegurando que el mismo se encuentre a la altura de la tapa de la base. Si fuera necesario reponer el agua con agua destilada (no sobrepasar los orificios de la bandeja)
- 3- Verificar que la junta de la tapa esté en buenas condiciones, sin roturas ni grietas. Ante la posibilidad de un mal cierre de la misma, proceder a su reemplazo.
- 4- Colocar la carga a esterilizar o descontaminar dentro del autoclave (sobre la tapa de la base) en forma ordenada y en recipientes de forma tal que ningún objeto quede suelto dentro de la misma y dejando un espacio no menor de 5 cm. entre dichos elementos y el borde superior del autoclave.
- 5- Colocar en el interior de la carga un control de esterilización. Ubicar los controles en aquellos lugares donde considere más difícil el acceso al vapor.
- 6- Cerrar la tapa superior del autoclave y ajustar las mancuernas con las manos de a pares enfrentados. Nota: no ajustar las mancuernas del autoclave empleando objetos como, palos, caños, etc. La tapa está diseñada para ser cerrada con la fuerza de las manos.
- 7- Verificar que la espita esté abierta. En caso contrario abrirla
- 8- Abrir la llave de paso del gas y encender el mechero.
- 9- Regular la entrada de aire para que la llama del mechero sea máxima controlando que la totalidad del mismo esté encendida.
- 10- Colocar la manguera proveniente de la espita en una lata con agua fría.

- 11- Verificar la purga del aire mantenido en el interior del autoclave. Cuando el aire interior se elimina totalmente, el sonido del burbujeo se hace metálico con golpe seco del vapor que reemplazó a aquel.
- 12- Comprobada la total eliminación del aire interior, cerrar la espita suavemente.
- 13- Una vez alcanzada la presión de trabajo (1,0 atm. 121 °C), regular la llave de gas de manera tal que la presión se mantenga en dicho valor.
- 14- Mantener la temperatura y presión constantes durante 15 minutos si se trata de medios de cultivo, y 30 minutos si se trata de material de vidrio o decontaminación. Verificar constantemente que se mantengan dichas condiciones.
- 15- Transcurrido el tiempo indicado en 14 proceder a cerrar la llave de gas.
- 16- Una vez que la presión haya alcanzado el valor 0 atm., proceder a abrir la espita permitiendo que se igualen las presiones interior y exterior.
- 17- Colocarse los guantes de amianto.
- 18- Liberar las mancuernas y proceder a abrir la tapa del autoclave, cuidando alejar el rostro de la boca del autoclave.
- 19- Verificar se disponga de lugar para descargar el contenido del autoclave.
- 20- Retirar los elementos del interior del autoclave.
- 21- Verificar el control de esterilización. En caso contrario debe repetirse la operación si la carga lo permitiera. En caso de repetirse la operación de esterilización ésta deberá ser registrada.
- 22- Si se hubieran derramado elementos en el interior del autoclave, proceder a su vaciado y limpieza utilizando agua, detergente y esponja.
- 23- Recordar si se vuelve a esterilizar inmediatamente, reponer el agua fría en el fondo, caso contrario se limpia y seca perfectamente.
- 24- Colocar la tapa de manera tal que cubra la boca del autoclave.

### ***Los “NUNCA” del autoclave***

Nunca purgar demás, porque variará el volumen de los medios, soluciones, etc. Recordar que el agua está hirviendo.

Nunca cerrar la espita fuerte. Las sales del agua y el efecto de la dilatación de los metales harán que no la pueda abrir con facilidad una vez finalizada la esterilización.

Nunca abrir el autoclave si la presión manométrica no está en cero. Recordar que la presión que indica el manómetro está por encima de la normal. Es decir, autoclavar a 1 atm. Significa 1 atm por encima de la presión atmosférica normal (760 mm Hg).

### **Normas de uso general de la estufa:**

- Cargar la estufa de esterilización a temperatura ambiente

- Disponer los materiales acondicionados en forma tal que:
  - No impida la convección de aire
  - No toque las paredes
- Ubicar controles de esterilización en aquellos lugares donde se considere de difícil acceso el calor.
- Controlar la posición del termómetro (el bulbo no debe tocar la carcasa metálica ni puerta) pues se podrían registrar temperaturas falsas mayores a los reales.
- Poner en funcionamiento
- Cuando alcanza la temperatura deseada, comenzar a contar el tiempo de esterilización.
- Terminado el tiempo de esterilización, dejar enfriar antes de retirar el material.

### **Filtros**

Los docentes indicarán sobre la preparación, acondicionamiento, esterilización, empleo y uso de los distintos tipos de filtros.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Gnass SI, de Andrade Stempluk V. (2008). Manual de Esterilización para Centros de Salud. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C.,
- Ahel, JC. (2013). Gas Plasma de peróxido de hidrógeno: Nueva tecnología para esterilizar materiales biomédicos a bajas temperaturas. Trabajo final de grado de Farmacia. FCEQyN – Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones. Argentina.
- Basualdo J. A., Coto C. E., de Torres R. A. (2006). Microbiología biomédica. 2° Ed. Editorial Atlante. Buenos Aires. Argentina.
- Benson H. J., (2002). *Microbiological Applications: A Laboratory Manual in General Microbiology, with Previsions Per Bergey's Manual, 8th Ed. McGraw Hill.* Universidad Estatal de Pensilvania. EEUU
- Cuadernillo de Trabajo Práctico N°2: Esterilización. Cátedra de Biotecnología. Departamento de Ingeniería Química. Facultad Regional Rosario. Universidad Tecnológica Nacional. Argentina.
- Medvedeff, M.G., Bargardi, S, Jerke, G; Horianski, M.A.; Amer, L. (2006) Guía de Trabajos Prácticos. Catedra de Microbiología e Inmunología. 1° Parte. Editorial Universitaria de UNaM. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones. Argentina.
- Mims C., Playfair J., Roitt I., Wakelin D., Williams R. (1999). Microbiología Médica. 2° Edición. Hartcourt Brace. Madrid. España
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. (2017). Microbiología Médica. 8° Ed. Elsevier. España. Grafica Muriel.
- Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. (2013). Introducción a la Microbiología. 9° Ed. Editorial Medica Panamericana. Impreso en China.

---

*Profesoras responsables, 1° edición 2006: Dra Jerke Gladis, Dra Medvedeff Marta G. †*

*Profesoras responsables, 2° edición 2019: Dra Castrillo Maria Lorena.*

## **Trabajo Practico N° 7**

### **MEDIOS DE CULTIVOS.**

#### **OBJETIVOS**

- Comprender el concepto de utilidad y composición de Medios de cultivo microbianos
- Conocer los diferentes tipos de medios de cultivo existentes para el cultivo de microorganismos en el laboratorio.
- Identificar los pasos a seguir en la preparación de un medio de cultivo.

#### **7.1. INTRODUCCIÓN**

Para el estudio de las características de los microorganismos: bacterias, hongos y diagnóstico microbiológico es necesario obtener un cultivo puro de los mismos. Para ello se deben utilizar en los laboratorios medios de cultivo. que les ofrezcan los nutrientes y las condiciones óptimas de crecimiento.

#### **Definición**

Un medio de cultivo es aquella solución que contiene los nutrientes necesarios para recuperar, multiplicar, aislar e identificar los microorganismos bajo condiciones favorables de temperatura y pH, intentando reproducir artificialmente las condiciones de su hábitat natural.

#### **Utilidad de los medios de cultivo**

Los medios de cultivo se utilizan para una amplia variedad de propósitos en el laboratorio, tales como:

- 1- Aislamiento y propagación de bacterias, hongos, y en algunos casos, parásitos de animales y del hombre.
- 2- Estudio de las propiedades culturales, fisiológicas, metabólicas, morfológicas, antigénicas y patogénicas de los microorganismos que sirven, entre otras cosas, para su identificación. Por ejemplo: producción de ácido y gas, en medios de fermentación de hidratos de carbono o hemólisis de eritrocitos en medios de agar sangre, etc.
- 3- Transporte y conservación de microorganismos.
- 4- Estudio de la sensibilidad de los gérmenes a los antimicrobianos.
- 5- Producción de antígenos, por parte del microorganismo, para desarrollo de vacunas y preparación de suspensiones biológicas para diagnóstico serológico.
- 6- Selección de mutantes o variantes genéticas microbianas

## Composición de medios de cultivo microbianos

Los medios de cultivo deben incluir los elementos indispensables para satisfacer todas las necesidades nutricionales de los microorganismos

Los componentes más importantes son:

- 1- Agua: constituye aproximadamente el 80-95% del medio de cultivo, permitiendo mantener en solución o suspensión a los demás constituyentes del medio.
- 2- Peptonas: se obtienen por hidrólisis ácida o enzimática de proteínas. Se denominan según el origen de la proteína, por ej: de gelatina, de carne, de soja o de lactoalbúmina. Constituyen una fuente fundamental de nitrógeno, pero también de carbono y azufre.
- 3- Extractos de carne vacuna: son concentrados de productos hidrosolubles de la carne de composición indefinida (corazón, cerebro, músculo o hígado de buey) aportan elementos muy ricos como xantina, glucógeno, vitaminas, oligoelementos, etc
- 4- Hidratos de carbono: los medios de cultivo pueden contener cualquier clase de mono, di y polisacárido; se los usa habitualmente como fuente de energía para el germen, o de lo contrario para el estudio de su capacidad fermentativa.
- 5- Minerales: habitualmente se los usa en forma de sales inorgánicas. Los más utilizados son sodio, calcio, potasio, cloro, fósforo, azufre, hierro, cobre y magnesio; el uso de un determinado mineral depende de las exigencias del microorganismo en estudio.
- 6- Factores de crecimiento: y otras sustancias que los microorganismos son incapaces de sintetizar por si solos, como aminoácidos, vitaminas, bases púricas y pirimidínicas.
- 7- Agentes selectivos: son sustancias químicas que adicionadas al medio de cultivo impiden el desarrollo de un grupo de microorganismos sin inhibir otros. Son utilizados como agentes selectivos:

- Colorantes: 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. por ejemplo, cristal violeta (inhibe bacterias Gram (+), verde brillante se usa en medios altamente selectivos p/eliminar la flora acompañante Gram(+) y Gram (-) en bacterias
- Sustancias indicadoras: 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. Por ej: colorantes indicadores de pH como el azul de timol, rojo de fenol, azul de bromotimol; sales de hierro que detectan la producción de H<sub>2</sub>S produciendo ennegrecimiento del medio de cultivo; telurito de potasio que cuando se reduce a telurio y confiere color negro a las colonias.
- CINa: en altas concentraciones inhibe a casi todas las bacterias excepto las halófilas.

- pH: ej. pH 5,6 en medio Sabouraud p/hongos; pH 8,0-9,0 para aislamiento de *Vibrio cholerae*
- Antimicrobianos: cloranfenicol, cicloheximida, sulfamidas.
- Agentes reductores: se adicionan a los medios para hacerlos selectivos y proveer desarrollo de microorganismos anaerobios. Ej.: ácido ascórbico, tioglicolato de sodio, cisteína, etc.
- Otros agentes selectivos: citrato de sodio, telurito de sodio, selenito de sodio, sales biliares, etc.

8- Sustancias de enriquecimiento: son sustancias que adicionadas al medio de cultivo permiten el desarrollo de microorganismos exigentes. Se emplean Sangre total humana o de cualquier otro animal o, sus componentes (plasma, suero, etc.).

9- Agentes solidificantes: se le incorporan para obtener medios de cultivo sólidos o semisólidos. El más utilizado es el agar, que es un polímero extraído de algas rojas, aunque es líquido a 45 °C-100 °C, por debajo de 45 °C comienza a solidificar, dando lugar a un gel resistente a la hidrólisis bacteriana.

### **Factores ambientales que afectan el crecimiento**

El desarrollo de un microorganismo en un medio de cultivo, depende de una serie de factores ambientales (Figura 1), los más destacables son:

1- Composición: aceptores y donadores de H, fuente de C, fuente de N, minerales y factores de crecimiento.

2- pH (concentración de iones hidrógeno). La mayoría de los organismos tienen una gama de pH bastante estrecha, crecen mejor a pH de 6,0-8,0. Los acidófilos crecen a un pH menor de 5, Ej para *Thiobacillus thiooxidans*, pH óptimo=2,0; mientras que los basófilos desarrollan a pH superiores a 8, Ej. *Alcaligenes faecalis* crece a pH=8,5. El ajuste se logra con NaOH o KOH y ClH. La estabilidad del pH se asegura mediante la adición de tampones como el sistema  $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ .

3- Temperatura: la temperatura óptima para el desarrollo de las diferentes especies microbianas varía ampliamente, las formas psicrófilas, crecen mejor a temperaturas bajas entre 15-20 °C, las mesófilas a 30-37°C, temperatura óptima para la mayoría de los microorganismos de interés médico y las termófilas a 50-60 °C.

4- Atmósfera y potencial redox: Depende del tipo de respiración que posea el microorganismo, pueden ser, aerobios o anaerobios facultativos se incuban en presencia de  $\text{O}_2$ ; las anaerobias estrictas requieren un 85% de  $\text{N}_2$  10% de  $\text{H}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$  y los microaerófilos un 5% de  $\text{O}_2$ , 10% de  $\text{CO}_2$  y 85% de  $\text{N}_2$ .

5- Fuerza iónica y presión osmótica: en menor grado, puede ser necesario controlar factores como la presión osmótica y la concentración salina. La mayoría de los organismos crecen bien

en medios ordinarios. Otras como las bacterias halófilas requieren altas concentraciones salinas y las osmófilas, requieren presiones osmóticas altas.

6- Hidratación: la presencia de agua es indispensable para el crecimiento bacteriano, por lo que deberá estar presente en los medios de cultivo en cantidad suficiente.

7- Tiempo. Es fundamental controlar el tiempo de desarrollo de los microorganismos que puede variar de 18 a 24h, 48h, 72h, 5-7 días hasta un mes según de que microorganismos se trate.

8- Luz ambiental: la mayoría de los microorganismos crecen mejor en la oscuridad que en presencia de luz solar. Hay excepciones evidentes como sería el caso de los microorganismos fotosintéticos.



Figura 1: Factores ambientales que influyen en el desarrollo de los microorganismos.

## 7.2. MEDIOS DE CULTIVOS. CLASIFICACION

Los medios de cultivo en microbiología se pueden clasificar:

### 7.2.1. Según su consistencia (estado físico):

Según su consistencia, los medios de cultivo pueden ser líquidos, sólidos o semisólidos.

**7.2.1.1 Medios líquidos**: Como se presentan en ese estado son llamados también caldos. Los constituyentes están disueltos en agua sin sustancias solidificantes. Se utilizan sobre todo para inocular muestras o cuando se cultiva un único microorganismo para obtener una masa microbiana u observar las características de crecimiento; también sirven para elaborar las

curvas de crecimiento. Ej. caldo tioglicolato, caldo cerebro-corazón, caldo nutritivo (CN), caldo Sabouraud, caldo extracto de malta, otros.

**7.2.1.2 Medios sólidos:** Se preparan a través de medios líquidos agregándoles un agente gelificante. Los más utilizados con la gelatina y el agar. La gelatina es una proteína animal obtenida de los huesos. Tiene la limitación de que es hidrolizada por muchas bacterias y porque su punto de fusión es bajo.

El agar agar es un polímero de azúcares obtenido de algas marinas. Es una molécula insoluble en agua fría pero soluble en agua caliente. Una solución de entre 1,5-2% de agar forma un gel firme. Permiten el crecimiento de los microorganismos en el interior o en la superficie sólida. Ej. Agar nutritivo (AN), agar eosina-azul de metileno (EMB), otros.

**7.2.1.3 Medios semisólidos:** Se preparan a partir de los medios líquidos agregándoles el agente solidificante en una proporción menor, generalmente poseen 0,15 % de agar. Uno de sus principales usos es para la investigación de la movilidad de los microorganismos., por ejemplo la movilidad; por el medio SIM (Sulfhidrilo-Indol-Movilidad). También se emplean como medio de transporte de muestras clínicas; medio de Stuart.

## 7.2.2. Según su utilización:

Según su utilización los medios de cultivo pueden clasificarse en medios comunes, medios de enriquecimiento, selectivos, diferenciales, de identificación, de conservación y de transporte.

**7.2.2.1 Medios mínimos o comunes:** Son aquellos que poseen los componentes mínimos para que pueda producirse el crecimiento de microorganismos que no necesiten requerimientos especiales. El más conocido es el agar nutritivo o agar común, resultante de la adición de agar al caldo nutritivo para bacterias y el agar glucosado de Sabouraud para hongos.

**7.2.2.2 Medios enriquecidos:** Son aquellos que, además de las sustancias nutritivas normales, incorporan una serie de factores indispensables para el crecimiento de microorganismos exigentes o fastidiosos. Este enriquecimiento se hace por agregado de por ejemplo: sangre, leche, bilis, huevo, etc. Ej. -Agar sangre (AS) aporta el factor hemático X (Hemina), adecuado para el cultivo de Neumococos, Estreptococos y otras bacterias exigentes. Agar chocolate (ACh) aporta los factores hemáticos X y V (NAD; Nicotina adenina dinucleótido), utilizado para el aislamiento de *H. influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*

**7.2.2.3 Medios de enriquecimiento:** Generalmente son caldos, destinados a promover el crecimiento de los microorganismos, Ej. CN, o estimular el desarrollo de bacterias presentes en

número escaso en una mezcla de varios grupos bacterianos. Ej. Caldo Selenito que estimula el crecimiento de un número pequeño de Salmonellas presentes en heces y suprime el desarrollo de un número mucho mayor de microorganismos de la flora normal. Este es uno de los pocos medios que tiene una doble función, selectivo y de enriquecimiento.

**7.2.2.4 Medios selectivos:** Son aquellos utilizados para favorecer el crecimiento de ciertas bacterias inhibiendo el desarrollo de otras. La selección se puede conseguir ya sea añadiendo inhibidores (colorantes, antibióticos o sales biliares), modificando algunas propiedades físicas (concentración de cloruro de sodio, pH) o alterando algunas condiciones de cultivo como la temperatura y atmósfera de incubación (O<sub>2</sub>). Ejemplo: Medio de Lowestein - Jensen para Micobacterias, I

-Agar Mac Conkey posee sales biliares y cristal violeta que inhiben las bacterias gram positivas.

-Agar EMB: Los colorantes integrantes de la fórmula inhiben los microorganismos Gram (+). Se usa p/aislamiento de bacilos entéricos. Permite diferenciación de *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y otros. *E. coli* se observa vercosa c/centro negro y brillo metálico, las otras más grandes, mucosas, confluentes c/centro pardogrisáceo

-Agar Mc Conkey: Contiene mezcla de sales biliares y cristal violeta que inhibe a microorganismos Gram (+); lactosa como fuente de C y rojo neutro como indicador de pH, sirve para la comprobación de la degradación de dicho azúcar.

-Agar SS (agar Salmonella-Shigella): Se utiliza para aislamiento de Salmonellas y Shigellas a partir de heces/alimentos. El verde brillante, sales biliares, alta concentración de tiosulfato y citrato, inhiben considerablemente la flora acompañante.

-Agar manitol salado: Posee alta concentración de NaCl (7,5%). Desarrollan Estafilococos patógenos.

-Agar Thayer Martin: Medio altamente selectivo, contiene vancomicina, colistín, trimetroprima y nistatina. Ideal p/aislamiento de gonococos y meningococos porque inhibe flora acompañante.

**7.2.2.5 Medios diferenciales:** Se utilizan para poner en evidencia características bioquímicas que ayuden a diferenciar géneros o especies. Contienen compuestos químicos o indicadores sobre los que determinados microorganismos adquieren coloraciones específicas o reaccionan de una manera determinada. En estos se incluyen diversos colorantes e indicadores de pH y otros componentes, que actúan como indicadores de las actividades enzimáticas y ayudan a clasificar los microorganismos aislados. Ejemplo: el agar EMB tiene eosina y azul de metileno que nos permite diferenciar *Escherichia coli* la cual forma colonias verdes (con brillo metálico a la luz reflejada), de otras enterobacterias que forman colonias de color rosa salmón. Chromagar Candida permite diferenciar distintas especies de levaduras, Agar cisteína-lactosa deficiente en

electrolitos (CLDE), permite la diferenciación de bacterias fermentadoras de lactosa de las no fermentadoras, otros

**7.2.2.6 Medios de identificación:** Son aquellos que se utilizan para poner en evidencia alguna cualidad bioquímica que nos permite reconocer la identidad de un microorganismo. Ejemplo: el Agar TSI que permite determinar la capacidad de un microorganismo de atacar un hidrato de carbono específico, con producción o no de gas, junto con la posible producción de ácido sulfhídrico, Agar citrato, Agar fenilalanina desaminasa, agar DTM(dermatofitos), agar Candida, otros

**7.2.2.7 Medios de conservación:** Se utilizan para conservar una cepa microbiana. Su composición favorece el mantenimiento de los microorganismos que se siembran en él, permitiendo mantener su viabilidad en el laboratorio a fin de realizar diversos estudios. Aunque el método ideal para conservarlas es la liofilización, se pueden utilizar medios con glicerol o leche que se mantienen a bajas temperaturas. Ej. caldo tripticasa-soya+glicerina.

**7.2.2.8 Medios de transporte:** Son medios de cultivo especiales para transporte de materiales, líquidos o semisólidos cuya finalidad es mantener viables sin reproducción (o mínimamente) durante un tiempo a los microorganismos presentes, permitiendo con posterioridad recuperar incluso a los que están minoritariamente presentes. Se usan por ejemplo para el transporte de muestras clínicas e hisopos que fueron utilizados en el control de superficies que no pueden sembrarse inmediatamente. Ejemplo: medio Cary Blair el cual es especialmente útil para la búsqueda de *Vibrio* spp. a partir de muestras rectales, medio Stuart.

**7.2.2.9 Medios para estudios de sensibilidad a antimicrobianos:** Son aquellos en los que sus componentes no deben interferir con la actividad de los antimicrobianos y no deben incluir sustratos que los microorganismos usen como vía metabólica alternativa a la vía inhibida. Ej. agar Mueller Hinton.

**7.2.2.10 Medios para recuento de bacterias:** Son sólidos o líquidos selectivos o no. Permiten conocer la cantidad de bacterias contenidas en materiales tales como agua, leche, carne, muestras clínicas, etc. Estos medios no son inhibidores y se utilizan para recuento total. Ej. Agar para recuento en placa (PCA), caldo Mac Conkey, agar CLDE etc. Para recuento de hongos se puede usar agar HyL (hongos y levaduras).

### 7.2.3. Según su composición y origen

Según su composición los medios de cultivo pueden ser complejos o indefinidos, sintéticos o definidos, o semisintéticos:

**7.2.3.1 Medios naturales o indefinidos:** Son los preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal, cuya composición química exacta se desconoce ya que son el producto de realizar infusiones y extractos de materiales naturales complejos. Son medios muy ricos nutricionalmente aunque indefinidos químicamente. Ejemplo: digeridos de extracto de carne o extracto de levadura.

**7.2.3.2 Medios sintéticos o definidos:** Son aquellos que contienen en su composición exclusivamente sustancias químicas conocidas y disueltas en agua en proporciones determinadas, resultando un medio de composición perfectamente definida.

**7.2.3.3 Medios semisintéticos:** Es una mezcla de los medios anteriores. Llevan algunas sustancias químicas cuya naturaleza y cantidad conocemos, junto con sustancias de naturaleza y composición indefinidas.

### 7.3. Preparación de los medios de cultivos

En el comercio existe una gran variedad de medios de cultivo deshidratado que facilitan la labor de los laboratorios de microbiología y que garantizan una buena calidad de funcionamiento.

La preparación de los mismos se realiza de acuerdo a los siguientes pasos (Figura 2):

1. Disolución del medio de cultivo deshidratado
- 2- Ajuste de pH.
- 3- Fraccionamiento en tubos (este paso en algunos casos se puede obviar)
- 4- Esterilización.
5. Conservación de medios de cultivo, listos para el uso.

1- Disolución del medio de cultivo deshidratado. El medio de cultivo deshidratado se pesa exactamente siguiendo las indicaciones del rótulo del envase y se coloca en un recipiente adecuado para su preparación luego se rehidrata agregando aproximadamente la mitad de la cantidad necesaria de agua limpia, destilada/desmineralizada recientemente y cuya reacción sea lo más cercana a la neutralidad y se agita para conseguir una suspensión homogénea. Después se incorpora la cantidad de agua restante, aprovechando esta adición para desprender e incorporar al conjunto las partículas de medio de cultivo que hubieran quedado adheridas a la pared interna del recipiente. El recipiente con el medio de cultivo se calienta

suavemente a baño María o vapor para favorecer la disolución completa de la mezcla. Los medios de cultivo que no contienen agar ni gelatina (caldos), no requieren calentamiento dado que los componentes son solubles en agua fría o templada

2- Ajuste de pH. Cuando se utiliza agua neutra para su preparación, los medios de cultivo muestran el valor de pH indicado para cada uno de ellos, a la temperatura de incubación prescrita en cada caso. A pesar de todo, se recomienda comprobarlo, sobre todo en el caso de lotes no recientes y proceder a su corrección si fuera necesario. Esto se realiza adicionando HCl 1N para acidificar o NaOH 1N para alcalinizar.

3- Esterilización. Antes de su esterilización, y dentro de lo posible, es conveniente distribuir el medio en porciones más pequeñas, por ejemplo, en los recipientes definitivos en los que posteriormente se lleve a cabo el trabajo (excepto placas de Petri).

Si las normas de preparación no indican otra cosa, la esterilización se lleva a cabo en autoclave, a 121°C, durante 15 minutos. En algunos casos, los medios contienen sustancias termolábiles y requieren otro tipo de esterilización como el vapor fluyente, la filtración por membrana, tindalización, etc..

Las temperaturas más altas y los calentamientos más prolongados que lo prescrito, perjudican la calidad del medio de cultivo.

4- Conservación de medios de cultivo, listos para el uso. Una vez concluida la esterilización los medios de cultivo preparados listos para su uso deben ser guardados en heladera a 4 °C de esta forma tienen un *tiempo limitado* de conservación. Cuando no se indique lo contrario se puede contar con una conservabilidad de varios meses bajo condiciones adecuadas.

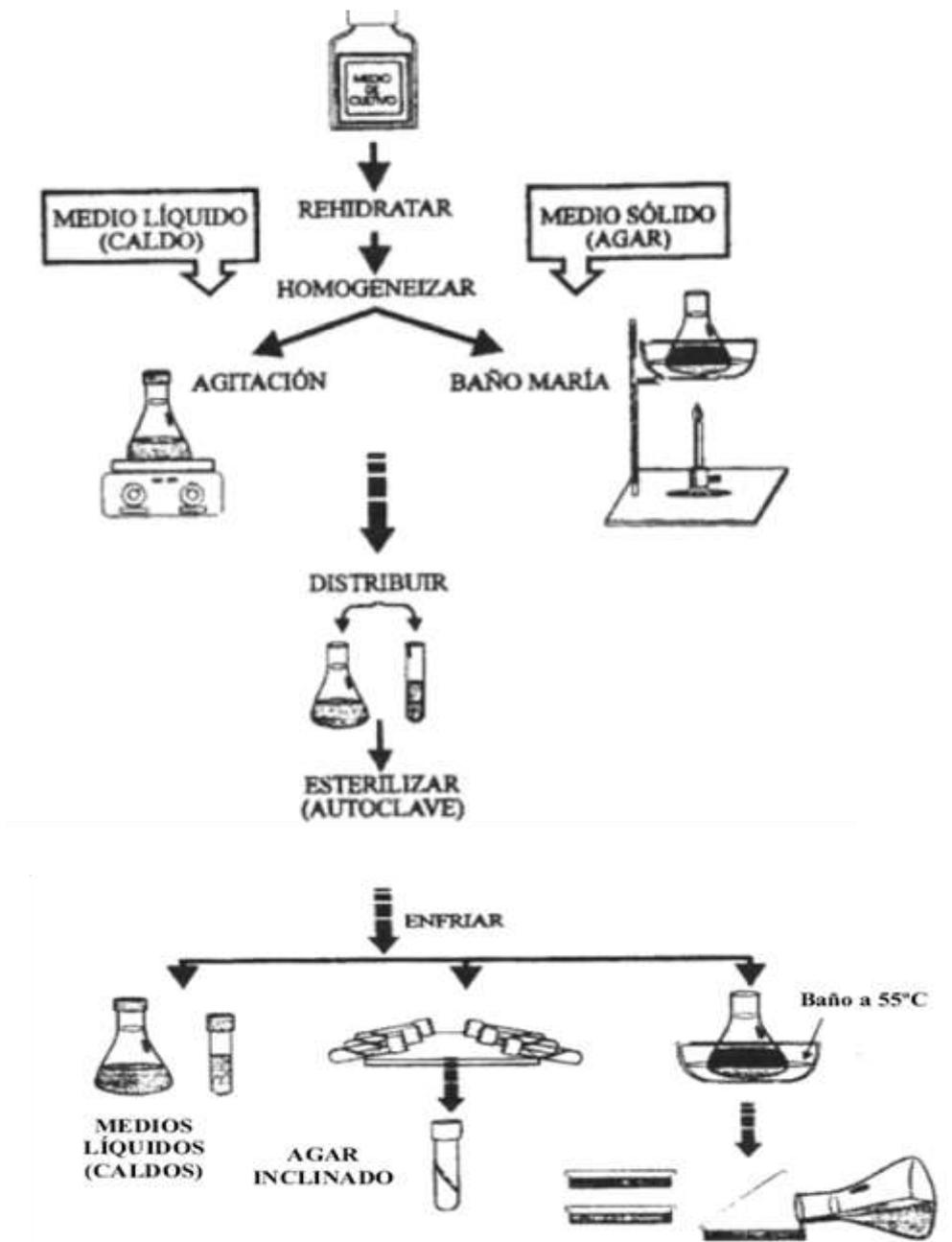
En caso de no disponer de heladera, es posible su conservación durante 1-2 semanas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

Deberán *protegerse contra el desecamiento* del medio de cultivo que contienen, precintando con cinta adhesiva su borde lateral o guardándolas empaquetadas en varias bolsas de plástico o film de polietileno impermeables al aire, o tapando con tapones de goma esterilizados

Los *medios de cultivo líquidos*, envasados en tubos o matraces, deben cerrarse asimismo con capuchones impermeables al aire, o tapando con tapones de goma esterilizados

En los *medios de cultivo que contengan aditivos* susceptibles de deteriorarse, conviene conservar el medio basal preparado, y completarlo cuando se necesite, mezclándole estérilmente los aditivos de dudosa conservabilidad (termosensibles, gases tóxicos, etc.)

Los medios de cultivo conservados en heladera deberán trasladarse a la estufa de cultivo o a la mesada de trabajo, aproximadamente una hora antes de su empleo, con el objeto de templarlos para evitar shock térmico en los microorganismos.



**Figura 2:** Preparación de medios de cultivo.

Fuente: Manual de Microbiología Práctica, Díaz, 2005

#### 7.4. Cuidados o precauciones en la preparación de los medios de cultivos

Para una buena preparación de los medios de cultivos se debe tener en cuenta:

- El empleo de *instrumental de vidrio y equipos limpios*, exentos de residuos de sustancias y detergentes. Los recipientes destinados a la preparación se enjuagaran con agua destilada/desmineralizada.
- Los recipientes deben ser lo suficientemente grandes para que el medio de cultivo que se prepara pueda ser agitado con facilidad.

- La tapa a rosca, tapón de plástico, han reemplazado al tapón de algodón para los tubos. Prevenir el empleo de tapas a presión.
- Los tubos que se enfrían bruscamente después de la esterilización reciben aire, el cual puede ser una fuente probable de contaminación, cuando se guardan los tubos de medios de cultivo durante un largo período.
- No se recomienda el calentamiento directo sobre la llama. Se debe preferir el empleo de un baño de María o de vapor. La disolución completa de los ingredientes, en el volumen de agua necesario antes de la esterilización, dará un producto constante, homogéneo, uniforme y sin grumos.
- Los frascos que contienen medios de cultivo con agar, se deben agitar después de la esterilización: ello dará la consistencia uniforme para el cultivo en placas.
- Se ha comprobado que para disolver medios de agar deshidratado que deberán ser sometidos al proceso de autoclave, conviene usar un horno de microondas, lo cual representa una considerable reducción de la generación de calor y una gran economía de tiempo.

### **7.5. Control de los medios de cultivo**

Antes de que un medio de cultivo sea considerado apto para ser utilizado se deben establecer tres tipos de controles.

Control de esterilidad. Se efectúa incubando durante 48 h a 35 °C y cinco días a temperatura ambiente algunas placas del lote, escogidas al azar. Se considerará apto, si al cabo de 7 días los controles muestran ausencia de cualquier tipo de crecimiento.

Control de calidad. Se realiza para comprobar que el medio contiene aquellos componentes que lo caracterizan. Para las comprobaciones se utilizan dos microorganismos distintos, uno que crece en el medio, o da positiva una determinada prueba, y otro que no crece, o la da negativa.

Control de caducidad. Para ello los medios deben estar perfectamente rotulados con nombre y fecha de preparación, de esta manera se podrá establecer en todo momento el tiempo que falta para llegar al límite de su utilización. Como término medio se pueden conservar en heladera a 4 °C de 6 a 21 días si no se introducen en bolsa de plástico, y de 10 a 90 días si se guardan en bolsas selladas.

## Práctica de Laboratorio N° 7

### MEDIOS DE CULTIVOS

#### CONSIGNAS:

1. Preparación y acondicionamiento de medios de cultivo comerciales
2. Elaboración de Medios de cultivo Naturales

El instructor dispondrá para cada comisión de trabajo los medios de cultivos y material necesario para la preparación de los mismos.

#### MATERIALES:

##### Material de vidrio

- Erlenmeyers
- Probetas
- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Varillas de vidrio

##### **Otros materiales**

- Balanza analítica
- Papel para pesar y algodón
- Mechero y trípode
- Baño termostatzado y recipiente para Baño María
- Tapones de plástico, goma, etc
- Papel, Hilo y/o gomitas
- Tiras de pH
- Solución de NaOH 1 N y Solución de HCl 1 N
- Material bibliográfico para la discusión grupal
- Solución de NaOH 1 N
- Solución de HCl 1 N

#### **1° PARTE. MEDIOS DE CULTIVO COMERCIALES**

Se utilizarán medios de cultivo comerciales deshidratados, en polvo o granulados para gérmenes comunes: líquidos, sólidos, semisólidos, selectivos, diferenciales, de enriquecimiento, enriquecidos, especiales, otros.

##### **Preparación de medios de cultivo comerciales**

1. Realizar el cálculo para pesar la cantidad del medio de cultivo deshidratado necesario para preparar la cantidad asignada por el instructor.

2. Disolver mediante calentamiento en caso de ser necesario, acorde a las indicaciones dadas en la presente guía.
3. Controlar el pH del medio
4. Distribuir en los recipientes adecuados correctamente rotulados
5. Acondicionar y esterilizar en autoclave
6. Almacenar los medios de cultivo preparados.

## **2° PARTE. MEDIOS DE CULTIVOS NATURALES**

1- Se realizarán grupos de discusión, para lo cual, cada grupo de trabajo investigará los medios de cultivo asignados por el instructor LA CLASE ANTERIOR, buscando información acerca de:

- Composición del medio de cultivo
- Utilidad y usos
- Su clasificación de acuerdo a:
  - Estado físico,
  - Naturaleza,
  - Usos

2- Cada grupo de trabajo acondicionará los medios de cultivo preparados la clase anterior en tubos, de acuerdo a su posterior uso.

- Fundir y luego dejar solidificar inclinado para obtener un pico de flauta: tubos de agar nutritivo, agar fenilalanina, bilis esculina, agar citrato, manitol salado, etc
- Tubos de TSI: fundir el medio y dejar solidificar inclinado pero con la precaución de dejar 3 cm de base y luego un pico de 3 cm.

3- Cada grupo de trabajo preparará **un medio de cultivo natural** asignado por los docentes.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brooks G. F., Carroll K.; Butel J. S. Morse S.; Mietzner T.; Miller S. (2011) *Jawetz Melnick Adelberg Microbiología Médica* 25 edición. McGraw Hill. Lange.
- Cerra H.; Fernandez M. C., Horak C., Lagomarsino M., Torno G., Zarankin E. (2013). Manual de Microbiología aplicada a las Industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos. Publicado como ebook en [ww.aam.org.ar](http://ww.aam.org.ar).
- Diaz R., Gamazo C., Lopez Goñi I. (2005) Manual Practico de Microbiología (3| Ed). Editorial Masson. Barcelona España
- Forbes, B. A., Sahm, D. y Weissfeld A. (2009). *Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico*. 12º Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- Madigan M.T., Martinko J. M., Bender K. S., Buckley D. H., Stahl D. A. (2015) *Brock. Biología de los microorganismos*. 14ª Edición. Editorial Pearson. Madrid, España.
- Medvedeff, M.G., Bargardi, S, Jerke, G; Horianski, M.A.; Amer, L. (2006) Guía de Trabajos Prácticos. Catedra de Microbiología e Inmunología. 1º Parte. Editorial Universitaria de UNaM. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones.
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. (2017). *Microbiología Médica*. 8º Ed. Elsevier. España. Grafica Muriel.
- Ureña J. L. (2002). *Microbiología Oral*. Editorial McGRAW-HILL. Interamericana de España.
- Winn W. C., Allen S. D., Janda W. M., Koneman E. W., Procop G. W., Schrenckenberger P. C. y Woods G. L. (2008). *Koneman. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas en color*. Edición 6ª. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.

---

*Profesoras responsables, 1º edición 2006: Dra Jerke Gladis, Dra Medvedeff Marta G. †*

*Profesora responsable, 2º edición 2019: Bqca Esp. Chade Miriam E.*

**Trabajo Practico N° 8**  
**CULTIVO DE MICROORGANISMOS.**  
**SIEMBRA Y AISLAMIENTO**

**OBJETIVOS**

- Conocer, describir y aplicar las diferentes técnicas de inoculación de microorganismos en los medios de cultivo.
- Conocer, describir y aplicar las diferentes técnicas de siembra para propagación y aislamiento de microorganismos.
- Distinguir la diferencia entre un método de siembra para cultivo de propagación y para aislamiento.

**INTRODUCCIÓN**

En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos no se encuentran aislados, sino integrados en poblaciones mixtas. Para llevar a cabo el estudio de estos microorganismos y de sus propiedades, es necesario separar unos de otros y trabajar con especies aisladas, obteniendo cultivos axénicos o puros.

Un cultivo axénico o puro es aquel que contiene un solo tipo de microorganismo y que procede generalmente de una sola célula; el crecimiento de ésta origina, en medio sólido, una masa de células fácilmente visible que recibe el nombre de colonia.

Para obtener cultivos axénicos o puros a partir de una población microbiana mixta, se utilizan las denominadas técnicas de aislamiento. Al efectuar este procedimiento, es necesario considerar que en el área de trabajo, existen muchos otros microorganismos; debido a esto, es necesario tomar precauciones para impedir que éstos penetren y contaminen los cultivos en estudio. La aplicación de estos procedimientos ha permitido propagar a los microorganismos en cultivos mixtos, así como el aislamiento y la obtención de cultivos puros, facilitando de este modo, el estudio, caracterización, aplicación y control de los mismos.

La esencia de la microbiología la integran, por lo tanto, dos clases de operaciones: el *aislamiento*, que es la separación de un microorganismo determinado de las poblaciones mixtas que existen en la naturaleza, y el *cultivo*, que es el crecimiento de poblaciones microbianas en ambientes artificiales (medios de cultivo) bajo condiciones de laboratorio. Estas dos operaciones entran en juego sin tener en cuenta la clase de microorganismo que está manejando el microbiólogo. Son básicamente similares para el estudio de virus, bacterias, hongos, algas, protozoos e incluso para pequeños invertebrados.

## **8.1. SIEMBRA DE MICROORGANISMOS**

Es la inoculación de un microorganismo de manera aséptica en un medio nutritivo adecuado, para lograr su desarrollo y reproducción. Cultivar un microorganismo significa promover intencionalmente el desarrollo de éste en medios de cultivo y condiciones de laboratorio controladas.

### **8.1.1. Objetivos de la siembra**

La inoculación de microorganismos en medios adecuados persigue dos objetivos fundamentales:

Aislamiento. Se realiza cuando se desea separar especies bacterianas contenidas en un material contaminado. Para permitir la separación de las colonias bacterianas, se siembran en medios de cultivo mediante técnicas de siembra para aislamiento. Debe realizarse siempre en medios de cultivo sólidos en placas de Petri.

Subcultivo. Puede realizarse en medios líquidos o sólidos, en las siguientes situaciones:

- Cuando el medio original está agotado de nutrientes, una parte del desarrollo de este medio se pasa a un nuevo medio con proporciones óptimas de nutrientes. Por ejemplo para el mantenimiento de cepas microbianas.
- Cuando se desea contar con un número importante de microorganismos. Por ejemplo para obtener cultivo axénico de las diferentes colonias aisladas en un medio de cultivo para aislamiento, con la finalidad de realizar otros estudios posteriormente, como ser pruebas bioquímicas, sensibilidad a antimicrobianos, entre otros.
- Cuando se coloca una sola especie bacteriana en distintos medios adecuados. Por ejemplo cuando se inocula en diferentes medios para identificación, con la finalidad de que se reproduzca en ellos para observar su comportamiento, definir propiedades, entre otras.

### **8.1.2. Normas generales para la inoculación**

- 1- Disponer de medios de cultivo adecuados y estériles.
- 2- Los medios de cultivo que van a inocularse deben estar a temperatura ambiente y libres de agua de condensación; en algunos casos conviene mantenerlos en estufa a 35-37°C. Es recomendable que las placas no estén fuera del refrigerador más de 2 horas, para evitar la desecación de la superficie del medio.
- 3- Antes de comenzar la inoculación, colocar ordenadamente y a mano todos los medios y utensilios que se van a necesitar sobre una mesada limpia, desinfectada y protegida con

papel de filtro (opcional). También es necesario disponer de recipientes adecuados donde depositar el material contaminado o desechable.

- 4- Efectuar todos los procedimientos microbiológicos en condiciones de asepsia y con utensilios perfectamente estériles. Manejar las muestras con precaución para evitar contaminaciones de las mismas o por causa del personal. Evitar corrientes de aire durante el trabajo. Es aconsejable el uso de guantes en todo momento y de mascarilla.
- 5- Trabajar siempre cerca de la llama del mechero para prevenir riesgos, sobre todo al abrir y cerrar los envases que contienen o reciben las muestras.
- 6- Establecer siempre la secuencia de los pasos a seguir en el procesamiento de la muestra con el fin de efectuar sin dificultades la inoculación.
- 7- Identificar las placas, tubos, portaobjetos y cualquier recipiente de la muestra, mediante una sigla y/o número que asegure su reconocimiento posterior. Las placas se rotulan en la base o parte inferior que contiene el medio. Es conveniente colocarlas invertidas, ya que facilita su identificación y manejo.
- 8- Flamear el ansa o instrumento utilizado en la siembra inmediatamente antes y después de su empleo. Evitar introducirlos caliente dentro de la muestra, porque se pueden formar aerosoles que originan contaminación ambiental y destrucción de los microorganismos por el intenso calor.
- 9- Flamear la boca de los recipientes después de abrirlos y antes de cerrarlos, con el fin de crear una atmósfera caliente que prevenga la contaminación. Los tapones se toman con el dedo meñique de la mano derecha y nunca se dejan sobre la mesada. Mientras permanezcan abiertos, los recipientes se posicionan oblicuamente para impedir la entrada del polvo del aire.
- 10- Mantener las placas a la altura de la llama del mechero y a unos 20 cm de la misma, siempre que se abran para asegurar una atmósfera estéril. La posición oblicua de la placa es la adecuada para la inoculación.

### **8.1.3. Instrumentos de siembra**

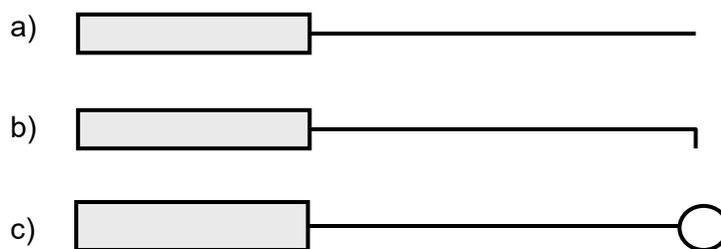
El material necesario para la inoculación primaria de muestras es relativamente simple. Pueden emplearse asa/ansa, hisopos, pipetas graduadas, pipetas Pasteur, micropipetas automáticas, jeringas, entre otros. La diseminación del inóculo en la superficie de una placa con medio sólido puede realizarse con ansa ojal, hisopo o espátula de Drigalski.

Asa/Ansa. Está confeccionada de un alambre de platino u otro material inserto en un mango para facilitar su manejo. Son más usadas las ansas de nicrón, un material mucho más barato y resistente o las ansas de plástico desechables y calibradas en diversas capacidades (1 µl, 5 µl, 10 µl). Existen distintos tipos de ansas que se utilizan en función del procedimiento microbiológico que se requiera realizar (Figura 1):

a) Ansa recta o aguja. Es un alambre recto fijado a un mango. Se utiliza para transferir colonias de una placa a otra, sobre todo para la inoculación por picadura de medios sólidos y semisólidos en tubos.

b) Ansa en L. Es un alambre recto con el extremo doblado a 90°. Se emplea principalmente para repique de hongos filamentosos en micología.

c) Ansa ojal. Es un alambre que en su extremo anterior tiene la forma de un círculo cerrado de 2-3 mm de diámetro. Su principal aplicación es la estriación de placas y la siembra en medios líquidos; el ansa calibrada se utiliza para recuento de colonias.



**Figura 8.1.** Asa/ansas empleadas en la siembra de microorganismos. a) recta, b) en L, c) ojal. (Esquema propuesto por Jerke, 2003).

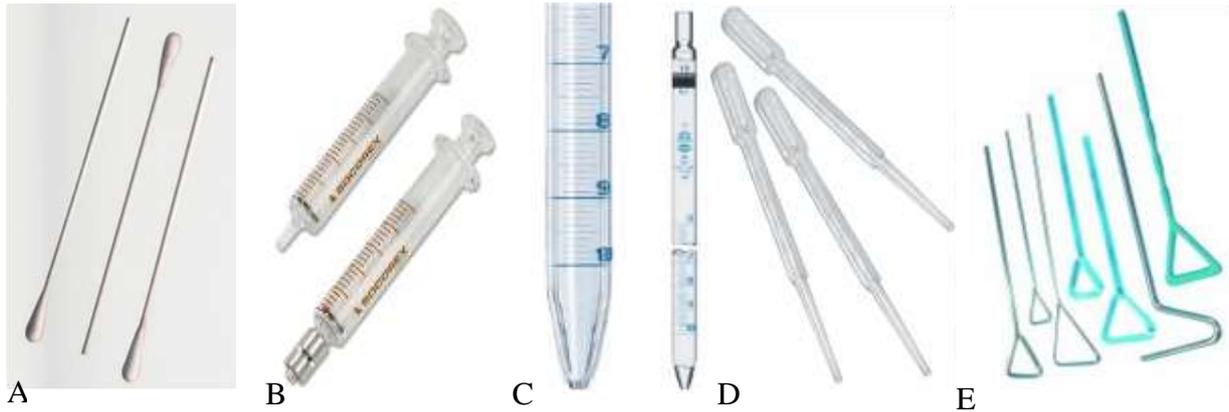
Hisopos. Son muy útiles para efectuar la primera parte de la siembra (inóculo primario) a partir de la muestra, para la transferencia de cultivos líquidos a placa y para la inoculación masiva de éstas a partir de suspensiones de colonias aisladas (Figura 8.2).

Jeringas. Son adecuadas para la inoculación de muestras tomadas mediante punción y transportadas dentro de ellas. Además, se aplican para los subcultivos en placa a partir de frascos de hemocultivo y para transferir cultivos líquidos (Figura 8.2).

Pipeta graduada o micropipeta. Se emplea para transferir un inóculo primario líquido que requiera de un volumen exactamente medido, para recuento de microorganismos (Figura 8.2).

Pipeta Pasteur. Utilizada para la inoculación de muestras líquidas o transferencia de cultivos líquidos. Actualmente se emplean con preferencia las pipetas estériles de plástico desechables (Figura 8.2).

Espátula de Drigalsky. Es una varilla fina de vidrio, acodada en ángulo recto en uno de sus extremos en forma de L o de triángulo equilátero. Se utiliza para inoculación masiva de placas, aunque su uso es muy limitado. Se emplea en muestras de alimentos y para recuento de hongos y levaduras (Figura 8.2).



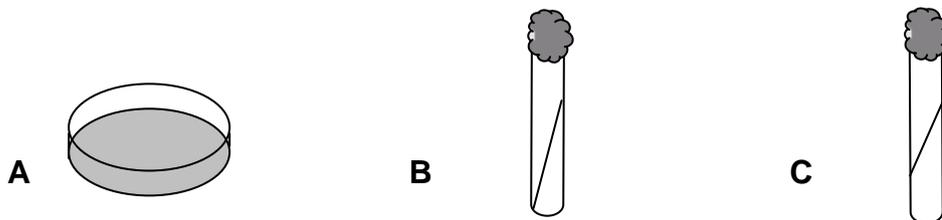
**Figura 8.2.** Instrumentos de siembra. A- hisopos, B- jeringas, C- Pipetas graduadas, D- pipetas Pasteur, E- Espátula de Drigalsky.

## 8.2. TÉCNICAS DE SIEMBRA

Los métodos básicos, para la siembra de gérmenes aerobios o anaerobios, se fundamentan en los mismos principios, pero varían según el estado físico de los medios de cultivo:

- 1.- Sólido
- 2.- Semisólido
- 3.- Líquido

**8.2.1. Siembra en medio sólido.** El medio sólido lo podemos tener en placas de Petri o en tubo de ensayo como agar inclinado o semiinclinado en pico de flauta (Figura 3).



**Figura 8.3.** A- Placa de Petri con medio de cultivo, B- Tubo de agar inclinado; C- Tubo con agar semiinclinado en pico de flauta. (Esquemas desarrollados por Jerke, 2003).

En medios de cultivo sólidos en placa de Petri las dos técnicas de siembra más utilizadas son:

- Agotamiento en estría. (Figura 8.4)
- Método de diseminación en superficie. (Figura 8.6)

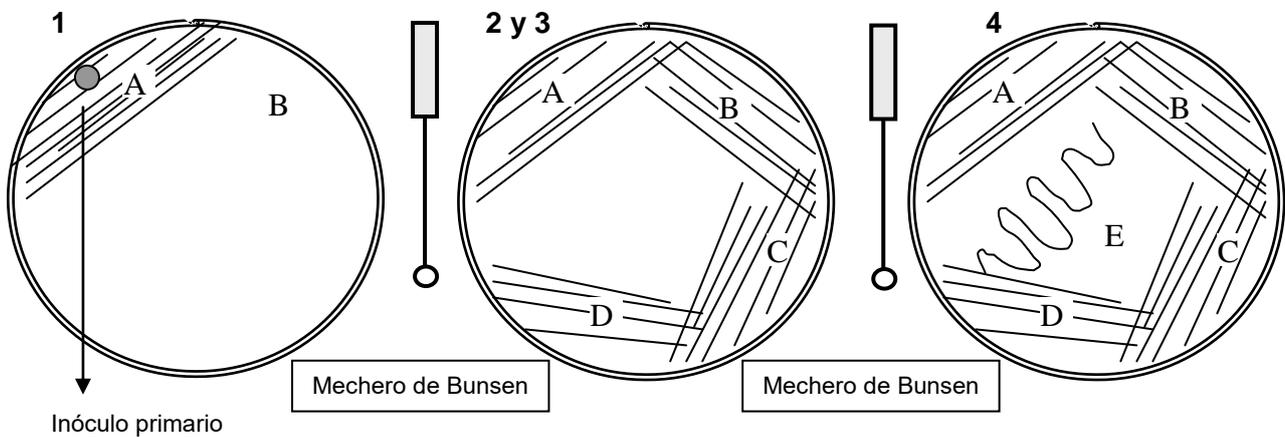
**Agotamiento en estría:** Se practica para obtener cultivos puros de muestras que contienen flora polimicrobiana. Es también útil para estudiar la morfología y propiedades hemolíticas de las colonias aisladas. Los pasos a seguir son:

1. Realizar el inóculo primario: Tomar una porción de la muestra con el anillo del ansa, pipeta o hisopo y depositar directamente sobre la superficie solidificada del medio en un extremo.

2. Una vez hecho el inóculo primario diseminar el material en la placa empleando un ansa ojal. Para ello, se toma la base de la placa de Petri donde se encuentra el medio de cultivo sólido fresco, y se la levanta hasta la altura de la llama del mechero, a unos 20 cm de la misma. Rápidamente para evitar la contaminación realizar estrías muy juntas con el ansa, pero sin hacer presión para no dañar el agar, en una parte de la placa equivalente a un cuarto (Figura 8.4 zona A).

3. Se flamea el ansa, se enfría y tocar 3 a 5 veces la siembra anterior. Se extiende de nuevo por otra zona de la placa haciendo nuevas estrías. Este proceso se repite en los dos cuadrantes restantes y finalmente se termina con un estriado en zig-zag.

4. Terminada la siembra, tapar las placas. Incubar.



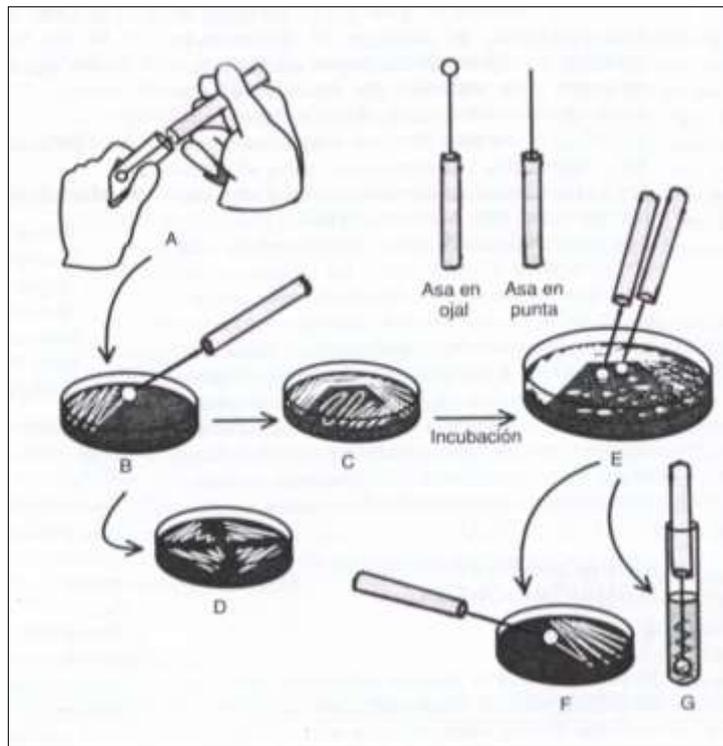
**Figura 8.4.** Método de agotamiento en estría en placas de Petri. **1.** Se coloca el inóculo primario en la zona A y se disemina en zig-zag con estrías muy juntas, **2.** Esterilizar el ansa, girar la placa 60°, tocar tres a cinco veces la última estría de la zona A y estriar la zona B, **3.** Reiterar el procedimiento 2 para la zona C y D, **4.** Para terminar dibujar una estría en zig-zag en la zona E (el espacio que queda entre los cuatro cuadrantes). (Esquemas desarrollados por Jerke, 2003).

El método descrito es el recomendado para el primocultivo de casi todas las muestras.

El propósito de esta técnica es diluir suficientemente el inóculo sobre la superficie del agar para obtener colonias bacterianas bien aisladas a partir de unidades formadoras de colonias.

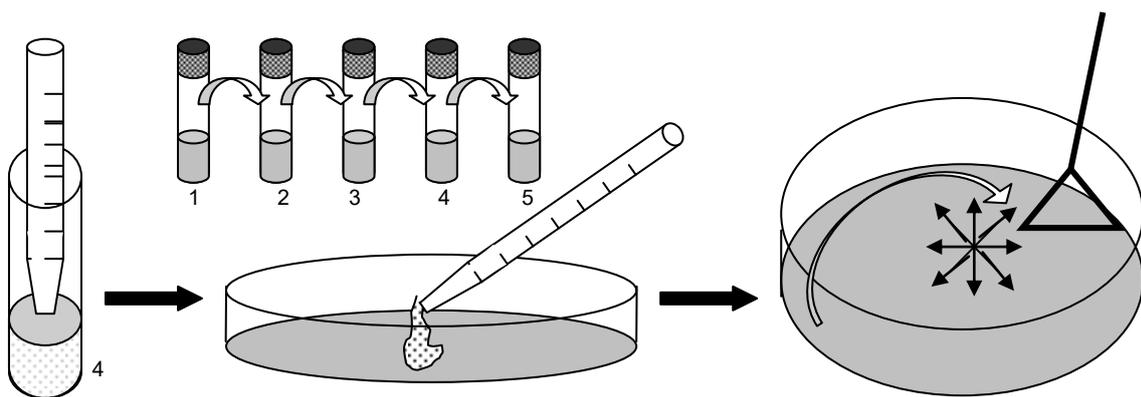
Las colonias aisladas obtenidas por el método de agotamiento en estría, se pueden luego subcultivar individualmente transfiriéndolas a otros medios a fin de obtener cultivos puros que pueden ser estudiados en medios diferenciales (Figura 8.5).

Existen otros métodos especiales de inoculación: Dilución y agotamiento, siembra en profundidad, siembra por goteo, entre otros.



**Figura 8.5.** Obtención de un cultivo microbiano puro a partir de una muestra líquida. A: toma del inóculo de la muestra mediante un asa ojal, B. siembra de un medio sólido para aislamiento, que puede realizarse por las técnicas C y D: en cinco estrías o en cuadrantes respectivamente E: tras la incubación, recoger una colonias bien aislada para obtener un cultivo puro. F y G. inoculación en medios sólidos (F) y líquidos (G) para obtener dicho cultivo puro. Fuente: Manual de Microbiología Práctica, Díaz, 2005.

**Diseminación en superficie:** consiste en distribuir la muestra de manera uniforme sobre la superficie del medio de cultivo contenido en la placa. Se utiliza para ello la espátula de Drigalsky, hisopo o ansa ojal (figura 8.6).



**Figura 8.6.** Método de diseminación en superficie con espátula de Drigalsky. (Esquemas desarrollados por Jerke, 2003).

Cuando se utiliza una espátula de Drigalsky (Figura 8.6) se coloca el inóculo primario con una pipeta graduada o micropipeta en el centro de la placa y luego se disemina el inóculo en la superficie del medio sólido, mediante:

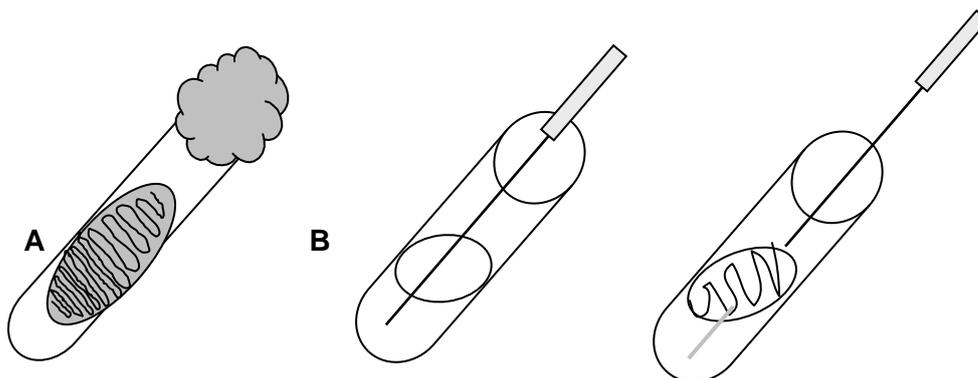
- 20 movimientos concéntricos, girando la placa en el sentido de las agujas del reloj
- movimientos de vaivén que cubran toda la placa

Las espátulas de Drigalsky se disponen en un vaso de precipitado conteniendo etanol y se esterilizan por el flameado de la espátula mediante la acción de la llama del alcohol.

Es el método adecuado para el recuento de colonias y para la realización del antibiograma por el método de difusión (utilizando ansas calibradas y espátula de Drigalsky).

Los **medios sólidos en tubo** se utilizan para la transferencia de cultivos puros y para estudios bioquímicos. El medio puede estar dispuesto en forma inclinada (agar inclinado), o semi-inclinados (pico de flauta).

En tubos con agar inclinado se coloca el inóculo en el fondo del tubo y se comienza a estriar desde la base del tubo, sembrando en "S" en la superficie inclinada (Figura 7.A). En el caso de medios sólidos en tubos semi-inclinados en pico de flauta se inocula primero atravesando el agar en profundidad, y luego de retirar el alambre de la parte profunda se continúa en "S" en la superficie (Fig. 7.B).

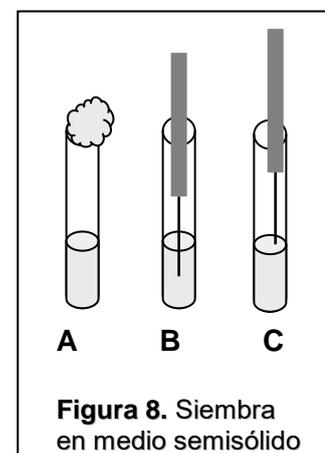


**Figura 7.** Método del agotamiento en estría. A. en tubos con agar inclinado, B. en tubos semi-inclinados en pico de flauta. (Esquemas desarrollados por Jerke, 2003).

**8.2.2. Siembra en medio semisólido.** Se utiliza el método de la picadura o punción. Es fundamentalmente útil para dos fines:

- Observación de movilidad de los microorganismos.
- Licuación de la gelatina.

En estos casos se utiliza ansa aguja. Para la siembra se utilizan medios de cultivo semisólidos en tubos de ensayo, solidificados verticalmente (Figura 8.A). Se realiza una punción central y vertical con el ansa cargada con el inóculo (Figura 8.B), cuidando de retirarla por la misma perforación practicada al penetrar al medio con ella (Figura 8.C).



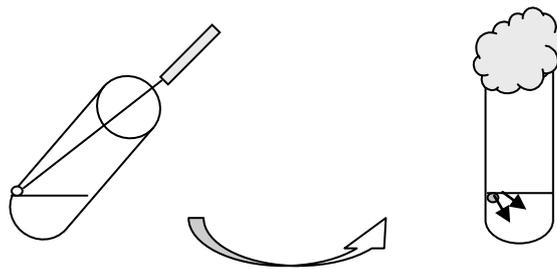
**Figura 8.** Siembra en medio semisólido

Un movimiento en abanico durante la inoculación de este medio de cultivo puede dar como resultado un patrón de desarrollo a lo largo de la línea de siembra que se puede interpretar falsamente como movilidad bacteriana.

Una vez retirada la aguja, se flamea la boca del tubo, se tapa y se lleva a incubar. La movilidad se observa con un desarrollo microbiano en todo el medio o en parte de él, lo que indica que los microorganismos sembrados son móviles. Caso contrario, el desarrollo es solamente en el lugar de siembra o picadura.

**8.2.3. Siembra en medio líquido.** Los medios de cultivo a inocular líquidos o caldos, están SIEMPRE distribuidos en tubos, o Erlenmeyer. El cultivo de procedencia puede encontrarse en placa de Petri, en tubo (caldo), o en pico de flauta.

Si se desea transferir colonias desarrolladas en medio sólido, ya sea en placa o en tubos, se toca el cultivo con ansa aguja u ojal, extrayendo una parte de ellas en las condiciones de esterilidad ya estudiadas. Luego se quita el tapón del tubo a inocular, se flamea la boca del tubo y se procede como se ilustra en la Figura 8.9.



**Figura 8.9.** Siembra en medio líquido. (Esquemas desarrollados por Jerke, 2003).

Inclinar el tubo a un ángulo de aproximadamente  $30^\circ$  y acercar el ansa con el material a inocular a la superficie interior del vidrio, justo sobre el punto en el que la superficie del líquido forma un ángulo agudo. Realizar movimientos sobre el vidrio para disgregar el cultivo. Cuando el tubo de cultivo se vuelve a la posición vertical, el área de inoculación queda sumergida debajo de la superficie.

También se puede partir del desarrollo en medio líquido. En este caso, quitar el tapón de algodón con el dedo meñique de la mano derecha, tomando el tubo con el cultivo en la mano izquierda, elevando el mismo hacia la llama del mechero, para flamear su boca, tratando de mantenerlo inclinado. Introducir el ansa, previamente esterilizada, en el tubo y tomar la muestra sumergiendo el ansa en el cultivo. Se siembra a un medio de cultivo líquido, introduciendo la aguja o anillo cargada y agitando luego con la misma dentro del tubo para producir homogeneización de la carga microbiana aplicada, y desprendimiento la totalidad de los microorganismos del ansa. Posteriormente flamear la boca del tubo, taparlo y llevar a incubar.

### 8.3. INCUBACIÓN DE MEDIOS INOCULADOS

**Acondicionamiento para la incubación:** para el caso de cultivos bacterianos las placas sembradas se apilan invertidas (tapa hacia abajo), y para el caso de cultivos fúngicos con la tapa hacia arriba. Los tubos sembrados se incuban en posición vertical.

**Temperatura:** después de la inoculación, los medios deben incubarse a temperatura óptima lo más pronto posible, pues el retraso limita la capacidad de crecimiento de algunos microorganismos delicados y favorece el desarrollo de contaminantes, sobre todo en los cultivos líquidos.

La temperatura óptima de incubación para la mayoría de las bacterias está próxima a la corporal (35-37°C). Solo en ocasiones se incuban los cultivos a temperaturas más elevadas con el fin de seleccionar algún patógeno, o a menor temperatura para lograr el aislamiento de los que no toleran los 37°C. Determinadas levaduras y la mayoría de los hongos filamentosos crecen mejor a 28-30°C.

Es importante que la temperatura de incubación se mantenga en los límites establecidos durante todo el proceso.

**Atmósfera de incubación:** Dependiendo de los requerimientos de oxígeno, la incubación se realiza en atmósfera ambiente, microaerófila o anaerobia.

Incubación en atmósfera con CO<sub>2</sub>: Las bacterias que precisan una tensión de CO<sub>2</sub> para desarrollarse son las llamadas capnófilas. Esta atmósfera, del 5-10% de CO<sub>2</sub> se consigue incubando las colonias bacterianas en recipientes de cierre hermético con una vela encendida en su interior (método de extinción de la llama). La llama consume parte de O<sub>2</sub> existente en el interior del recipiente y lo sustituye por CO<sub>2</sub>. Como norma general los medios con sangre o hemoderivados se incuban en atmósfera con CO<sub>2</sub> pues en ellos se investiga cualquier tipo de microorganismos.

Incubación en atmósfera microaerófila: la atmósfera debe contener una concentración de O<sub>2</sub> baja (5-7%), una tensión de CO<sub>2</sub> próxima al 10% y un 80% de nitrógeno. Esta atmósfera puede conseguirse utilizando una campana de anaerobiosis sin catalizador. Existen comercialmente sobres Gaspar que generan la atmósfera conveniente. La incubación de estos cultivos se mantiene como mínimo hasta 48 hs.

Incubación en condiciones anaerobias: esta atmósfera se logra mediante el sistema Gaspar que utiliza una campana de vidrio o plástico con cierre hermético. La incubación se prolonga hasta 48 hs como mínimo, por la lentitud de crecimiento de muchas bacterias anaerobias.

**Tiempo de incubación:** los cultivos se examinan después de 18-24 hs de incubación, algunas bacterias necesitan incubación adicional para desarrollarse bien y han de mantenerse hasta 48 o 72 hs. En casos especiales, en relación con el tipo de muestra o el microorganismo que se investiga, la incubación se prolonga por más tiempo: 7 días para el hemocultivo, 15 días para hongos dermatofitos, 30 o más para las micobacterias, entre otros.

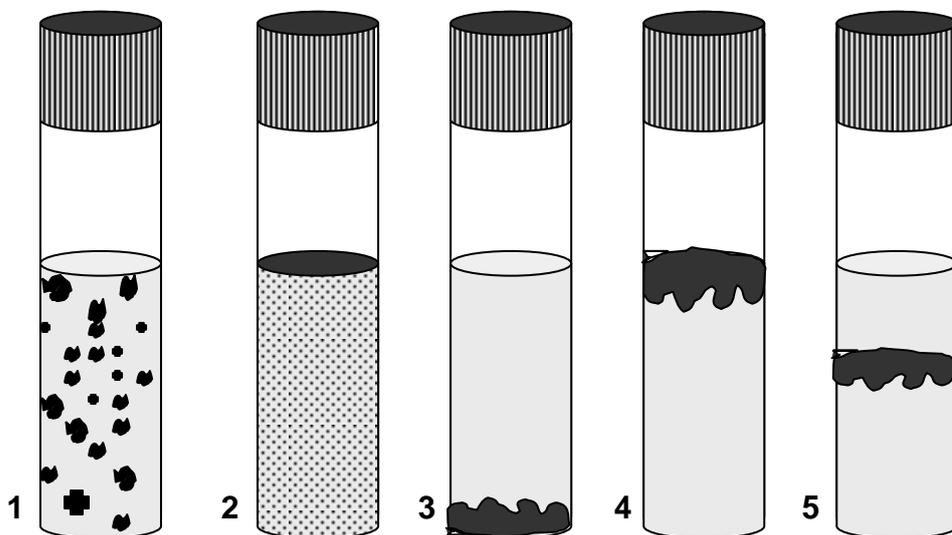
## 8.4. INTERPRETACIÓN DE LOS CULTIVOS

La interpretación de los cultivos primarios, luego del periodo de incubación, requiere una considerable destreza. El microbiólogo debe evaluar si hubo desarrollo microbiano en medios líquidos o sólidos y decidir si se requieren procedimientos adicionales.

### 8.4.1. Evaluación de medios líquidos.

Los tubos que contienen medios primarios no se utilizan comúnmente para evaluar la morfología de las colonias, sino más bien para favorecer el desarrollo/multiplicación de las bacterias de modo que se puedan aislar en cantidad suficiente para su estudio.

El desarrollo microbiano en medios líquidos se visualiza mediante: presencia de grumos, turbidez, depósito en el fondo o como un velo superficial o intermedio (Figura 8.10).



**Figura 8.10.** Desarrollo microbiano en medio líquido. 1. Presencia de grumos, 2. Turbidez, 3. Depósito en el fondo, 4. Velo superficial, 5. Velo intermedio. (Esquemas desarrollados por Jerke, 2003).

### 8.4.2. Evaluación en medios sólidos.

Se efectúa mediante un examen macroscópico de las colonias y microscópico de los microorganismos en cuestión:

1. Observando las características macroscópicas y cantidad relativa de cada tipo de colonia aislada en agar, tanto en cultivos bacterianos como fúngicos.
2. Observando los cambios en el medio que rodea las colonias, que reflejan la actividad metabólica específica de las bacterias/hongos recuperados.
3. Microscópicamente: Principalmente en cultivos bacterianos, observando la pureza, reacción de Gram y morfología de las bacterias de cada tipo de colonia.

**8.4.2.1. Características macroscópicas de las colonias.** La evaluación de las características macroscópicas de las colonias se realiza habitualmente mediante el examen visual del desarrollo en la superficie de las placas de agar (Tabla 4.1).

La inspección de los cultivos se lleva a cabo sosteniendo la placa con una mano y observando la superficie del agar para comprobar la presencia de desarrollo bacteriano. Se debe estudiar con cuidado cada placa debido a que las bacterias aisladas inicialmente a partir de muestras constituyen a menudo cultivos mixtos y puede haber una variedad de tipos de colonias. Las colonias puntiformes constituidas por bacterias de desarrollo lento pueden pasar inadvertidas entre las de mayor tamaño. Incluso dos géneros bacterianos diferentes, pueden crecer de manera similar en determinado medio de cultivo.

Durante el examen, las placas se deben inclinar en distintas direcciones con iluminación brillante directa, de modo que la luz sea reflejada desde diversos ángulos. Algunos microbiólogos utilizan una lupa o un microscopio de disección para ayudarse en la detección de colonias minúsculas y observar mejor sus características. Las placas de agar sangre se deben examinar también a trasluz, empleando iluminación brillante, a fin de detectar reacciones hemolíticas en el agar.

**Tabla 1.** Características de las colonias usadas en la identificación de bacterias.

1. <i>Tamaño</i>	2. <i>Forma</i>		3. <i>Elevación</i>		4. <i>Borde</i>	
Diámetro en mm	Puntiforme		Plana		Entero	
	Circular		Elevada		Ondulado	
	Filamentosa		Convexa		Lobulado	
	Irregular		Monticular		Aserrado	
	Rizoide		Umbeliforme		Filamentosa	
	Fusiforme		Umbilicada		Rizado	
5. <i>Color</i>	6. <i>Superficie</i>	7. <i>Densidad</i>	8. <i>Consistencia</i>	9. <i>Olor</i>		
Blanco	Lisa o rugosa	Opaca	Butirosa	Los microorganismos que exhiben olores característicos son: - <i>Pseudomonas</i> spp (zumo de uva) - <i>Proteus</i> spp (chocolate quemado) - <i>Streptomyces</i> spp (sótano enmohecido) - <i>Clostridium</i> spp (fétido, nauseabundo)		
Amarillo	Mate o	Translúcida	Viscosa			
Negro	Brillante	Transparente	Membranosa			
Beige	Seca o	Entre otras.	Quebradiza			
Naranja	cremosa		Entre otras.			
Verde, etc.	Invasiva o superficial Entre otras.					

Fuente: Esquemas desarrollados por Jerke, 2003.

### 8.4.2.2. Cambios en el medio que rodea las colonias.

Los cambios en el medio que rodea las colonias microbianas, otorgan datos útiles para detectar actividad metabólica del microorganismo en cuestión. Se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Reacciones en medio agarizado utilizadas en la identificación de bacterias.

1. <i>Hemólisis en agar sangre</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- <u>Alfa</u>: halo de hemólisis parcial de glóbulos rojos alrededor de las colonias con coloración verde del medio.</li><li>- <u>Beta</u>: halo de hemólisis total de glóbulos rojos alrededor de las colonias, debido a la lisis de los glóbulos rojos.</li><li>- <u>Gamma</u>: no hay hemólisis de glóbulos rojos ni cambio en el medio que rodea la colonia.</li></ul>
2. <i>Producción de pigmentos en medio de agar.</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Pigmentos hidrosolubles que colorean el medio.</li><li>- Piocianina</li><li>- Pigmentos fluorocrómicos.</li><li>- Pigmentos no difusibles confinados a las colonias.</li></ul>
3. <i>Cambios en medios diferenciales.</i>	En los medios diferenciales se incluyen diversos colorantes, indicadores de pH y otros componentes que actúan como indicadores de las actividades enzimáticas y ayudan a identificar las bacterias aisladas.

Estas características son útiles en la selección de otros medios y pruebas diferenciales apropiadas para completar la identificación de los aislamientos.

**8.4.2.3. Características microscópicas.** Las impresiones basadas en la observación de las características de las colonias pueden ser confirmadas luego estudiando extendidos coloreados con tinciones apropiadas, dependiendo del microorganismo en estudio

## **Práctica de Laboratorio N° 8**

### **CULTIVO DE MICROORGANISMOS. SIEMBRA Y AISLAMIENTO**

#### **Consignas.**

Los grupos de trabajo realizarán de acuerdo a las instrucciones del docente lo siguiente:

#### A. Acondicionamiento de los medios de cultivo

- 1- Fundir los medios de cultivos sólidos, preparados en prácticos anteriores, a baño María. Una vez fundidos dejar enfriar aproximadamente a 50-60°C. A esta temperatura es posible tomar el Erlenmeyer sin quemarse y disminuye la formación de gotas de condensación en la tapa de las placas.
- 2- Distribuir en placas y tubos estériles, a razón de 20 mL por placa y 3 mL por tubo en condiciones de esterilidad.
- 3- Dejar solidificar sobre la mesada, las placas en posición horizontal y los tubos en forma de agar inclinado o en pico de flauta.
- 4- Una vez solidificado el medio de cultivo llevar las placas a la estufa a 37°C por aproximadamente 15 minutos, para secar el agua de condensación que pudiera haberse formado.

#### B. Siembra

- 1 Siembra de muestras para aislamiento en placas en distintos medios de cultivos empleando diferentes técnicas.
- 2 Siembra del material en estudio en tubos con caldo, agar semi-sólido y agar inclinado y en pico de flauta.
- 3 Los cultivos bacterianos se incuban a 35-37°C, durante 18-24 hs, en posición invertida. Las placas de agar sangre y chocolate se incubarán en atmósfera con CO<sub>2</sub>, método de extinción de la llama.
- 4 Los cultivos fúngicos se incuban a 25-28°C durante 5 a 7 días, con la tapa hacia arriba.

#### C. Lectura e interpretación de los cultivos

- 1- Descripción de las características macroscópicas de las colonias de cultivos bacterianos y fúngicos.
- 2- Coloración de Gram y morfología celular de los cultivos bacterianos.

- 3- Repique de la/s colonia/s aisladas (por indicación del docente) a agar nutritivo en pico de flauta, para continuar con las pruebas de identificación.

### Materiales

- Placas y tubos estériles
- Medios de cultivos preparados
- Mechero y trípode
- Recipiente para baño María
- Ansas: aguja, ojal y en L
- Espátula de Drigasky
- Hisopos
- Recipiente para el material de descarte
- Muestras
- Recipiente para la atmósfera con CO<sub>2</sub>
- Vela
- Estufa de cultivo a 37°C (Bacterias)
- Estufa de cultivo a 25 °C (Hongos)

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Análisis de procesos de microorganismos. (2012). TECNICAS Y METODOS DE AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS. <https://conalepfelixtovar.wordpress.com/2012/09/26/tecnicas-y-metodos-de-aislamiento-y-seleccion-de-microorganismos/>.
- Brooks G. F., Carroll K.; Butel J. S. Morse S.; Mietzner T.; Miller S. (2011). *Jawetz Melnick Adelberg Microbiología Médica* 25 edición. McGraw Hill. Lange.
- CULTIMED (2003) 4ª Edición del Manual Básico de Microbiología CULTIMED publicado por PANREAC Química S.A. España.
- Diaz R., Gamazo C., Lopez Goñi I. (2005) Manual Practico de Microbiología (3ª Ed). Editorial Masson. Barcelona España
- Forbes, B. A., Sahm, D. y Weissfeld A. (2009). *Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico*. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- García Martos y cols. *Microbiología Clínica Aplicada*. P. 3ª Edición.1996. Editorial Díaz de Santos, S. A.
- Jerke (2003) *Guía de Practicas de Laboratorio. Apuntes para el estudiante de Microbiología de Farmacia*. Universidad del Norte. Encarnacion Paraguay
- Lennette E., Landes D. (1989). *Manual de Microbiología Clínica*. Editorial Panamericana.
- Medvedeff, M.G., Bargardi, S, Jerke, G; Horianski, M.A.; Amer, L. (2006) *Guía de Trabajos Prácticos. Catedra de Microbiología e Inmunología. 1º Parte*. Editorial Universitaria de UNaM. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones.
- Merck (1990). *Manual de medios de cultivo Merck*. Química Argentina. 1990.
- Stainer R. Y. Ingraham J. L., Wheelis M. L., Painter P.R. (2005). *Microbiología*. 2º Edicion. Editorial Reverté. 768 pag. Barcelona, España.
- Wikibooks (2015) Área Microbiología. Obtención de cultivos puros: siembra y aislamiento [https://es.wikibooks.org/wiki/Microbiolog%C3%ADa/Obtenci%C3%B3n\\_de\\_cultivos\\_puros:\\_siembra\\_y\\_aislamiento](https://es.wikibooks.org/wiki/Microbiolog%C3%ADa/Obtenci%C3%B3n_de_cultivos_puros:_siembra_y_aislamiento)
- Winn W. C., Allen S. D., Janda W. M., Koneman E. W., Procop G. W., Schrenckenberger P. C. y Woods G. L. (2008). *Koneman. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas en color*. Edición 6ª. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.

---

*Profesoras responsables, 1º edición 2006: Dra Jerke Gladis, -Dra Horianski Marta A.*

*Profesora responsable, 2º edición 2019: Dra Castrillo María Lorena*

## Trabajo Practico N° 9

### CONTROL MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL

#### OBJETIVOS

- Conocer métodos de monitoreo microbiológico para ambientes controlados.
- Realizar el control microbiológico de un ambiente elegido por el alumno.
- Observar y caracterizar, mediante observación macroscópica y microscópica, la diversidad microbiana del ambiente elegido por el alumno.
- Analizar e interpretar los resultados cualicuantitativos obtenidos.

#### INTRODUCCIÓN

El estudio de los ambientes controlados se inició con la industria electrónica y aeroespacial, así como en la industria farmacéutica para preparados estériles. Es en estas industrias, donde principalmente se realizan las descripciones de conceptos y límites para partículas aerotransportables viables y no viables, requeridos en los ambientes controlados. La industria farmacéutica, por ejemplo, requiere un programa exigente de control microbiológico del ambiente, ya que los medicamentos pueden contaminarse durante su fabricación por el aire, equipos, superficie de trabajo o el personal. La presencia y crecimiento de microorganismos en productos ya terminados puede ocasionar riesgos para la salud, o bien alterar las características fisicoquímicas que impedirán su comercialización. Por esta razón, todas las zonas de producción deben mantenerse en condiciones muy estrictas, con niveles mínimos de microorganismos y partículas que se denominan “zonas limpias”. Según las características requeridas, las zonas limpias se clasifican en diversos grupos que son equivalentes en todos los países. Por ejemplo, en la Unión Europea se consideran los grupos A, B, C y D cuyos límites de microorganismos por m<sup>3</sup> de aire son, respectivamente, menos de 1, 5, 100 y 500 (De la Rosa y Col., 2000).

Los controles microbiológicos también son requeridos durante otros procesos, en los que se manejan y manipulan productos asépticos y que se requieran los controles periódicos en ambientes controlados para contar con zonas/áreas limpias. Varias son las actividades de investigación en la que se requiere condiciones muy estrictas de control del nivel de partículas y/o microorganismos. Se necesita disponer de ambientes controlados para procedimientos asépticos, que no deben permitir una contaminación aérea microbiana más allá de ciertos límites bajos a fin de preservar la esterilidad del material con el cual se está trabajando. El control microbiológico por tanto, es necesario para la evaluación de la calidad microbiológica de zonas estériles en la industria farmacéutica, en gabinetes de seguridad, en laboratorios de investigación de Nivel de bioseguridad II, III y IV, así como también puede ser muy útil en estudios de la microbiota en ambientes naturales, en los cuales se busca determinar la

biodiversidad microbiana en relación con aspectos higiénico/sanitarios, posibles problemas de salud como alergias (microorganismos anemófilos y micotoxigénicos) y de deterioro (celulolíticos), entre otros .

La contaminación aérea será directamente proporcional no solo a la concentración de microorganismos en el aire, sino a la probabilidad de que estos accedan al elemento que no se debe contaminar, por ejemplo, boca de un frasco (D Aquino, 1999).

### **9.1. DEFINICIONES OPERATIVAS**

*Ambiente controlado.* Es cualquier área donde se controlan las partículas y microorganismos a niveles especificados (D'Aquino, 1999).

En los ambientes controlados, por lo general el aire ingresa a través de filtros de alta eficiencia (HEPA) que resguardan los ambientes de la contaminación que puede provenir de otras zonas adyacentes.

*Cuarto Limpio-* Un cuarto donde se controla la concentración de partículas en el aire para que cumpla con una “clasificación de limpieza” específica. Además, se controla la concentración de microorganismos en el ambiente. Cada clasificación de limpieza definida tiene asignada además un nivel microbiano del aire, de superficies y de indumentaria del personal (USP 30).

*Área limpia-* Un área que cuente con un control definido del medio ambiente con respecto a la contaminación con partículas o microbios. El área contará con instalaciones construidas y usadas de tal manera que se reduzca la introducción, generación y retención de contaminantes dentro de la misma (FA 7°), se controlan los parámetros fisicoquímicos y biológicos (D'Aquino, 1999).

*Zona Limpia-* Toda zona de un sistema de procesamiento aséptico en la que se controlan niveles específicos de partículas y microorganismos en el aire, correspondientes a las actividades desarrolladas dentro de ese ambiente, para que cumpla con niveles específicos de Clasificación de Limpieza (USP 30). Es un espacio donde se controlan las partículas aéreas (viables y no viables) y se halla construido para minimizar las mismas. Puede hallarse abierta o cerrada pudiendo o no estar vinculada a un área limpia (D'Aquino, 1999). Ej. Cabinas de bioseguridad.

*Recuento de Partículas Viables Transportadas por el Aire* (también denominado recuento microbiano aerobio total del aire)- Cuando se especifica un número de microorganismos, es el número máximo de unidades formadoras de colonias (ufc) por metro cúbico de aire (o por pie cúbico de aire) asociado con una Clasificación de Limpieza de ambiente controlado basada en el recuento de partículas del aire (USP 30).

*Sitios de Muestreo*- Ubicación geográfica documentada, dentro de un ambiente controlado, donde se hace el muestreo para evaluación microbiológica. En general, los sitios de muestreo se seleccionan según su potencial de entrar en contacto con el producto/envase/cierre (USP 30 NF 25).

*Muestreador de Aire*- Dispositivos o equipos usados para muestrear una cantidad medida de aire en un tiempo especificado, para cuantificar el estado microbiológico o de partículas del aire en el ambiente controlado (USP 30).

*Norma Federal 209E*- "Clasificación de Limpieza del Aire con respecto a Partículas en Cuartos Limpios y Zonas Limpias"- Es una norma aprobada por el Comisionado, los Servicios Federales de Suministros y la Administración General de Servicios, para su uso por todas las Agencias Federales. En la industria farmacéutica, la Norma Federal 209E se usa para especificar la construcción de ambientes controlados. La Clase 100, la Clase 10000 y la Clase 100000 generalmente están representadas en un sistema de procesamiento aséptico. Si el sistema de clasificación se basa en partículas de 0,5  $\mu\text{m}$  o mayores, estas clases en el sistema Sistema Internacional, corresponden a las Clases M3.5, M5.5 y M6.5, respectivamente (USP 30).

## **9.2. IMPORTANCIA DE UN PROGRAMA DE MONITOREO MICROBIOLÓGICO**

El monitoreo del número total de partículas, aun cuando se realice con instrumentación electrónica sobre una base continua, no provee información sobre el contenido microbiológico de ese ambiente. La limitación básica de los contadores de partículas es que ellos miden partículas de un tamaño 0,5  $\mu\text{m}$  o mayor. Los microorganismos ambientales generalmente no se encuentran flotando en el aire libremente o en células simples e independientes, sino que se encuentran agrupados, asociados con partículas de 10 a 20  $\mu\text{m}$ . Más aun, los contadores tradicionales no diferencian entre partículas inertes y microorganismos (células y esporas) flotando en el aire.

El conteo de partículas y el conteo de microorganismos viables dentro de ambientes controlados varían con la localización del muestreo y las actividades que se están desarrollando durante el monitoreo.

Algunas de las características más importantes a tener en cuenta en un programa de monitoreo microbiológico, que deberán adaptarse y/o ampliarse, dependiendo de la industria/investigación, y a su vez, a los procedimientos asépticos requeridos, son las siguientes:

1. El programa de monitoreo microbiológico para ambientes controlados debe evaluar la efectividad de las prácticas de limpieza y sanitización realizadas por el personal, que podría tener un impacto en la carga biológica del ambiente.

2. El programa de monitoreo microbiológico de rutina debe proveer suficiente información para asegurar que el ambiente durante el procesamiento del material, está operando dentro de un adecuado estado de control.
3. El monitoreo microbiológico ambiental y el análisis de los datos, por personal calificado, permitirá saber que el estado de control del medio ambiente de producción se mantiene bajo control a través del tiempo. El ambiente debe ser muestreado durante una operación normal para permitir la colección de datos significativos. Los muestreos deben ocurrir con los materiales en el área, las actividades de los procesos en funcionamiento, y el personal en su puesto de trabajo y en actividad.
1. El objetivo del programa es obtener una estimación representativa de la bio-carga del ambiente. Cuando se cuente con un número representativo de datos, se analizarán y se evaluarán tendencias de los mismos por parte de personal entrenado en el tema.
2. Un ambiente controlado es definido por certificación correspondiente a una operación estándar. Los parámetros que son evaluados incluyen integridad de filtros, velocidad del aire, patrones de aire, renovaciones de aire, presiones diferenciales. Estos parámetros pueden afectar la bio-carga microbiológica del ambiente.

El diseño, construcción, y las operaciones, pueden variar mucho entre distintas empresas, haciendo difícil generalizar requerimientos para los diferentes parámetros. No obstante, se proponen algunos límites para partículas y microorganismos, clasificando áreas y ambientes controlados, como se presentan en el siguiente apartado.

### **9.3. CLASIFICACIÓN DE CLASES DE AMBIENTES CONTROLADOS.**

Una gran proporción de productos estériles en la industria farmacéutica y biomédica se fabrican por procesamientos asépticos. Así también, los procedimientos de trabajo en investigación microbiología, requieren en muchos casos de procedimientos asépticos. Como el procesamiento aséptico se basa en excluir microorganismos del flujo del proceso y evitar que los microorganismos ingresen en los envases abiertos mientras se llenan y/o manipulan, la biocarga del producto así como la carga microbiana del ambiente de fabricación son factores importantes en la garantía de esterilidad de dichos productos y/o procedimientos asépticos.

El diseño y construcción de cuartos limpios y ambientes controlados se describen en la Norma Federal 209E. Esta norma de limpieza del aire se define mediante la concentración absoluta de partículas en el aire. Incluye los métodos usados para la asignación de la clasificación del aire en ambientes controlados y para el control de partículas en el aire. Este documento federal sólo se aplica a partículas en el aire dentro de un ambiente controlado y su propósito no es caracterizar la naturaleza viable o no viable de las partículas. En los

procedimientos asépticos existe una mayor preocupación acerca de las partículas viables (es decir, microorganismos) que sobre el total de partículas: La Norma Federal 209E, propone los límites aceptables de niveles de partículas para todas las partículas con tamaños iguales o mayores a 0,5 µm. La Tabla 9.1 describe la Clasificación de Limpieza del Aire con respecto a Partículas de la Norma Federal 209E.

**Tabla 9.1.** Clasificación de Limpieza del Aire con respecto a partículas.

Nombre de la Clase	Partículas iguales o mayores de 0,5 µm		
	Sistema estadounidense	(m <sup>3</sup> )	(pies <sup>3</sup> )
M1	—	10,0	0,283
M1.5	1	35,3	1,00
M2	—	100	2,8
M2.5	10	353	10,0
M3	—	1000	28,3
M3.5	100	3530	100
M4	—	10 000	283
M4.5	1000	35 300	1000
M5	—	100 000	2830
M5.5	10 000	353 000	10 000
M6	—	1 000 000	28 300
M6.5	100 000	3 530 000	100 000
M7	—	10 000 000	283 000

\* Adaptado de la Norma Federal 209E de los EE. UU., 11 de septiembre de 1992—“Clases de Limpiezas del Aire con respecto a Partículas en Cuartos Limpios y Zonas Limpias”.

Fuente: USP 30.

Aunque no se ha establecido una relación directa entre las clases de ambiente controlado de la norma 209E y los niveles microbiológicos, los laboratorios que requieren procedimientos asépticos, han usado estos niveles microbianos propuestos durante varios años, en especial, para la evaluación del cumplimiento de las GMP (buenas prácticas de manufactura) vigentes.

En general, se acepta que cuantas menos partículas se encuentren presentes en un cuarto limpio operativo u otro ambiente controlado, menor será el recuento microbiano en condiciones operativas, siempre que no existan cambios en el flujo de aire, temperatura y humedad.

Los recuentos de partículas, así como los recuentos microbianos dentro de ambientes controlados, varían según la localización del muestreo y las actividades que se desarrollan durante el muestreo. Debe realizarse el muestreo durante el funcionamiento normal para recopilar datos significativos La Norma Federal 209E define que se deberá muestrear un volumen suficiente de aire para detectar variaciones que exceden los límites especificados.

Los valores mostrados en la Tabla 9.2, Tabla 9.3 y Tabla 9.4 representan resultados de pruebas individuales y sólo se sugieren como guías (Farmacopea de los Estados Unidos de América 30 [USP 30], 2007).

**Tabla 9.2.** Guías de limpieza del aire en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en ambientes controlados (usando un muestreador de Ranura-Agar o su equivalente).

	Clase*	ufc por metro cúbico de aire**	ufc por pie cúbico de aire
SI	Usualmente aplicada en EE. UU.		
M3.5	100	Menos de 3	Menos de 0,1
M5.5	10 000	Menos de 20	Menos de 0,5
M6.5	100 000	Menos de 100	Menos de 2,5

\* Según se define en la Norma Federal 209E, septiembre de 1992.

\*\* Se deberá muestrear un volumen suficiente de aire para detectar variaciones que exceden los límites especificados.

Fuente: USP 30.

**Tabla 9.3.** Guía de Limpieza para superficies de equipos e instalaciones en ambientes controlados, empleando placas de contacto.

	Clase	ufc por Placa de Contacto*
SI	Usualmente aplicada en EE. UU.	
M3.5	100	3 (incluido el piso)
M5.5	10 000	5 10 (piso)

\* Las áreas de las placas de contacto varían de 24 a 30 cm<sup>2</sup>. Cuando se use el hisopado en el muestreo, el área cubierta debe ser igual o mayor de 24 cm<sup>2</sup> pero no mayor de 30 cm<sup>2</sup>.

Fuente: USP 30.

**Tabla 9.4.** Guías de limpieza para superficies en ambientes controlados sw la indumentaria del personal operativo, en UFC.

	Clase	ufc por Placa de Contacto*	
	Usualmente aplicada en EE. UU.	Guantes	Vestimenta e Indumentaria del personal
SI			
M3.5	100	3	5
M5.5	10 000	10	20

Fuente: USP 30.

Existen otras pautas similares a la 209E, tal es el caso de la Comunidad Europea donde la clase 100 se denomina A, la clase 10 000 corresponde a la C y la 100 000 a la D. Los límites sugeridos en esta clasificación se especifican en la Tabla 9.5.

**Tabla 9.5.** Guías de Limpieza del Aire en Unidades formadoras de colonias (UFC) en Ambientes Controlados, según la Comunidad Europea.

Clase	ufc/m <sup>3</sup> de aire	ufc/(4 h sedimentación espontánea)	Superficies*
A	1	<3	<3
C	<100	50	<25
D	<500	<100	<25

\* ufc por placa de contacto. Fuente: D'Aquino, (1999).

En las áreas limpias convencionales las partículas submicrómicas se mantienen dispersas y caen muy lentamente a diferentes distancias. La relación de desplazamiento horizontal en relación a la vertical de una partícula de 10 micrones es de 50 a 1. En un flujo laminar horizontal con velocidad de aire de 30 m/min, para una caída de 30 cm en una partícula de diferente tamaño se desplaza aproximadamente los metros señalados en la Tabla 6. En un flujo laminar la velocidad de la corriente de aire se fija en 27 m/min para impedir la decantación de las partículas (D'Aquino, 1999).

**Tabla 9.6.** Desplazamiento de las partículas en un flujo laminar.

Tamaño en micrones	Recorrido en metros
1	200
3	95
5	40
10	15

Fuente: D'Aquino, (1999).

Los científicos en general aceptan que los organismos transportados por el aire en ambientes controlados, pueden influir sobre la calidad microbiológica de los productos intermedios o finales fabricados en dichas zonas. También se acepta que la estimación de esos organismos transportados por el aire puede verse afectada por los instrumentos y procedimientos usados para realizar estos análisis. Por lo tanto, cuando se usen otros métodos o equipos, debe determinarse la equivalencia general de los resultados obtenidos. En la actualidad, los muestreadores más usados en la industria farmacéutica y de dispositivos médicos de los EE. UU. son los muestreadores centrífugos y por impacto (USP 30).

El método de gravedad es uno de los más antiguos, ya que permite identificar los microorganismos viables de los cultivos. Sin embargo, no es cualitativamente ni cuantitativamente exacto porque detecta, principalmente, los microorganismos que más persisten en el aire y de mayor tamaño, por lo que se recomienda para zonas sin turbulencia. Permite conocer la distribución de los microorganismos, que no se obtiene con los

muestreadores de aire forzado, para lo cual es necesario tomar muestras en distintos puntos de la zona que se controla (de la Rosa y Col., 2000).

Algunos autores han señalado la dificultad de comparar los resultados obtenidos por el método de gravedad con los métodos cuantitativos. Estudios experimentales realizados han encontrado que por el método de gravedad se detecta alrededor del 10% de los microorganismos presentes en el aire. No obstante, hace unos años Omeliansky ha desarrollado una fórmula, validada contra muestreadores de impacto, que permite trasponer los valores de UFC/ tiempo a UFC/m<sup>3</sup> (Bogomolova y Kirtsideli, 2009).

$$N \text{ (UFC/m}^3\text{)} = 5a \times 10^4(bt)^{-1}$$

Dónde:  
a= número de colonias por caja de Petri. b= superficie de la caja de Petri (cm<sup>2</sup>).  
t= tiempo de exposición (minutos).

En los últimos años se ha reconocido la importancia de controlar el nivel y tipo de contaminación del aire interior de edificios, oficinas y ambientes educativos, considerando que el 80 % del tiempo diario un individuo permanece en el interior de estos ambientes. A nivel mundial, para la OMS un ambiente interior se considera contaminado cuando el nivel de UFC/m<sup>3</sup> presente es mayor a 1000, mientras que a nivel regional, Brasil considera que un ambiente es contaminado cuando las UFC/m<sup>3</sup> en ambiente interior son mayores a 700 (Borrego Alonso & Perdomo Amistad, 2013).

Omeliansky propuso niveles de contaminación de acuerdo a las UFC/m<sup>3</sup> en los ambientes internos, considerando como contaminados a ambientes con un rango de UFC/m<sup>3</sup> de entre 700 y 1500 (Tabla 9.7).

**Tabla 9.7.** Niveles de contaminación propuestos por Omeliansky.

UFC/m <sup>3</sup>	Nivel de contaminación
Menor a 500	No contaminados
500-700	Poco contaminados
700-1500	Contaminados
Mayor a 1500	Altamente contaminados

Fuente: Bogomolova y Kirtsideli, 2009

Si bien se han establecido clasificaciones del nivel de contaminación fúngica de los ambientes internos de acuerdo a las UFC/m<sup>3</sup> presentes, debe tenerse en cuenta que el hecho de encontrarse géneros fúngicos capaces de generar patologías en el hombre, constituye en sí un factor de riesgo de tipo biológico para los individuos que habitan dicho ambiente, principalmente en el caso de personas susceptibles o inmunodeprimidas (Martinez, 2018).

#### 9.4. ASPECTOS INCLUIDOS EN EL CONTROL MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL.

Los aspectos relevantes para un adecuado nivel de saneamiento e higiene, debe abarcar al personal, instalaciones, equipos y aparatos, materiales y recipientes para el procedimiento microbiológico, productos de limpieza y desinfección y todo aquello que puede ser fuente de contaminación del producto. Estos aspectos se extienden a todos aquellos procesos que requieren procesamiento aséptico en laboratorios de investigación, ambientes hospitalarios, tales como quirófanos o nurseries, o procesos de producción de la industria farmacéutica o alimentaria.

En la Tablas 9.8 están listados los elementos que deberán ser incluidos en Programas de Monitoreo ambiental. Los métodos más comunes de monitoreo ambiental microbiológico, están resumidos en la tabla 9.9.

**Tabla 9.8.** Programas de Monitoreo Ambiental

<b>Componente</b>	<b>Comentarios</b>
<b>Agua</b>	Es el material básico más utilizado en la formulación de medios de cultivo y en el caso de la industria farmacéutica y biomedica, es el componente mayoritario de productos y formulaciones. El control microbiológico del agua es uno de los componentes esenciales del monitoreo ambiental.
<b>Gases a presión</b>	Aire, gas, nitrógeno a presión, y todos los elementos asociados (compresores, tubos, etc.) deben ser monitoreados periódicamente.
<b>Aire</b>	Este monitoreo incluye detección de partículas viables y no viables.
<b>Superficies</b>	Este monitoreo requiere el uso de medios de cultivo y toma de muestra apropiados para los diferentes tipos de superficies.
<b>Operarios</b>	Monitoreo de vestimenta de laboratorio y manos por impresión de dedos sobre placas de agar.

Fuente: Vazquez y Denoya, 2017.

En general, se realiza el control de superficies en áreas que entran en contacto con el producto de procesamiento aséptico y en áreas adyacentes. Para minimizar los trastornos en las operaciones críticas, el muestreo de superficie se realiza al finalizar las actividades.

El muestreo de superficies puede llevarse a cabo mediante placas de contacto o por el método de hisopo. Las placas de contacto llenas con agar nutritivo se usan al muestrear superficies regulares o planas y se incuban directamente por el tiempo la temperatura de incubación apropiados para recuentos de organismos viables. Puede usarse agar especializado para la cuantificación específica de hongos, esporas, etc. El método de hisopo puede usarse para muestrear superficies irregulares, especialmente los equipos. Se usa el hisopo como complemento de las placas de contacto para superficies regulares. El hisopo luego se coloca en un diluyente adecuado y se realiza el recuento microbiano estimado mediante la siembra de una alícuota apropiada sobre o en agar nutritivo especificado. El área

por donde se pasa el hisopo se define con una plantilla estéril de tamaño adecuado. En general, es entre 24 y 30 cm<sup>2</sup>. Las estimaciones microbianas se informan por placa de contacto o por hisopo.

**Tabla 9.9.** Monitoreo Microbiológico del aire, superficies y operarios

<b>Muestra</b>	<b>Método</b>	<b>Instrumentación y/o Referencia</b>
<b>Aire</b>	Impacto sobre agar	<i>Surface Air System (SAS)</i> y <i>Reuter Centrifugal Sampler (RCS)</i>
	Placas y Frascos de Sedimentación	Placas de Petri de 90 mm de diámetro y 14mm de altura con tapa, preferentemente de poliestireno cristal, esterilizadas por radiación gamma. Pueden obtenerse listas para usar conteniendo el agar o llenarse en forma aséptica en el laboratorio de uso. En forma similar se pueden usar frascos con medio líquido
<b>Superficies</b>	Hisopado	Pueden ser simplemente hisopos de distintos materiales o kits comerciales que incluyen hisopos más medios de transporte y crecimiento.
	Placa de Contacto	Pueden ser de preparado local, listas para usar o kit comerciales que proveen la placa y el vial con el medio líquido de cultivo elegido.
	Lavado	Este método permite la toma de muestras de gran superficie, de zonas que son inaccesibles o que no pueden ser desmontadas rutinariamente. Ej, equipos
<b>Operarios</b>	Monitoreo de vestimenta de laboratorio y manos por impresión de dedos sobre placas de agar	Este monitoreo permite evaluar el nivel de destreza en técnicas asépticas por parte del personal especializado en manufactura de productos farmacéuticos, biomédicos y/o investigación.

Fuente: Vazquez y Denoya, 2017.

En la Tabla 9.10 se detallan medios líquidos y sólidos usados para el muestreo o cuantificación de microorganismos en ambientes controlados.

Estos medios se encuentran disponibles comercialmente en forma deshidratada. También se encuentran disponibles listos para usar. Si se usan desinfectantes o antibióticos en la zona controlada, debe considerarse el uso de medios con agentes inactivantes adecuados.

La identificación de microorganismos aislados de las zonas críticas y lugares inmediatos a ellas debe tener prioridad sobre la identificación de microorganismos de zonas no críticas (USP 30).

**Tabla 9.10.** Medios de cultivo líquidos y sólidos utilizados para el muestreo y cuantificación de microorganismos.

Medios Líquidos*	Medios Sólidos*
Solución salina triptonada	Agar de digerido de caseína-soja
Agua peptonada	Agar nutritivo
Solución salina amortiguada	Agar extracto glucosado de triptona
Gelatina amortiguada	Agar lecitina
Gelatina amortiguada enriquecida	Agar infusión cerebro corazón
Infusión cerebro corazón	Agar para placa de contacto
Medio de caseína-soja	

\* Los medios líquidos y sólidos se esterilizan usando métodos validados.

Fuente: USP 30.

El aire contiene en suspensión diferentes tipos de microorganismos, especialmente bacterias y hongos. La presencia de uno u otro tipo depende del origen, de la dirección e intensidad de las corrientes de aire y de la permanencia y supervivencia de los microorganismos. Algunos se encuentran en forma de células vegetativas, pero lo más frecuente son las formas esporuladas debido a que sobreviven mejor en atmósferas secas.

En el aire se aíslan bacterias esporuladas de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, así como actinomicetos. Además son frecuentes los bacilos pleomórficos Gram positivos de los géneros *Corynebacterium*, *Arthrobacter* y otros. Los bacilos y cocos Gram negativos se encuentran en escasa proporción debido a que no sobreviven a la desecación.

Respecto a los hongos, los que más frecuentemente se aíslan son hongos filamentosos como *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* o *Mucor* y levaduras como *Rhodotorula* o *Candida*.

## 9.5. MONITOREO MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL

El objetivo del monitoreo es obtener estimaciones representativas de biocarga en el ambiente.

El monitoreo debe ser dinámico no solo en su frecuencia, sino en la ubicación apropiada de los sitios a monitorear.

### 9.5.1. Métodos de monitoreo

De los diferentes métodos de captación de microorganismos ambientales pueden emplearse sistemas activos, como el método que utiliza muestreadores de impacto que capta un volumen conocido de aire el cual impacta en una placa de Petri con un medio adecuado de cultivo. Este procedimiento es cuantitativo.

También pueden utilizarse sistemas pasivos, como ser la exposición de placas de Petri con medio de cultivo apropiado durante 60 minutos en el área a analizar, pero en este caso los resultados si bien no son cuantitativos, señalan las condiciones higiénicas del lugar. No obstante, hay una relación bastante aproximada entre uno y otro método.

La técnica que se emplea rutinariamente en análisis microbiológico ambiental es la **sedimentación por gravedad**. Este método permite determinar la carga microbiana de un ambiente problema. Los microorganismos suspendidos en el polvo o aerosoles sedimentan sobre la superficie de un medio rico, no selectivo o bien en medios selectivos contenidos en placas de Petri. Una vez tomada la muestra mediante la apertura de las placas en el ambiente deseado, éstas se incubarán en las condiciones que favorezcan el crecimiento del tipo de microorganismos que deseemos estudiar.

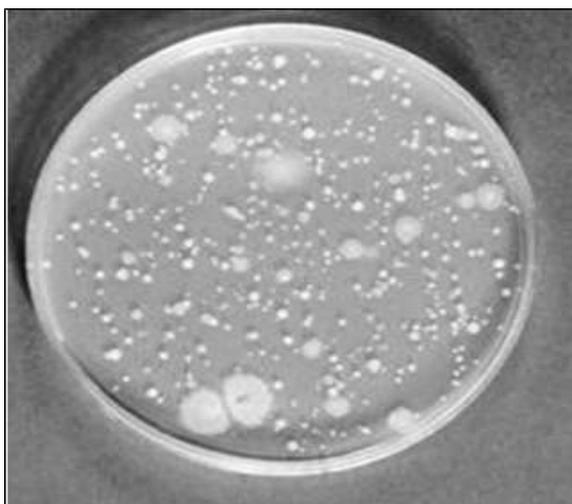
### 9.5.2. Frecuencia de monitoreo

Las áreas críticas requieren de mayor vigilancia. Una clase 100 debe monitorearse en cada tarea, una clase 10.000 se monitorea diariamente. Una clase 100.000 puede monitorearse semanalmente.

Todo dependerá de la naturaleza del producto y tipo de proceso involucrado. Cuanto mayor es la intervención del personal mayor importancia tendrá el monitoreo.

## 9.6. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se observará la aparición paulatina de diversos tipos de colonias. Aparecerán en primer lugar colonias bacterianas y al cabo del segundo o tercer día de incubación se observarán las colonias de levaduras, que se asemejan a las bacterianas, así como las características colonias algodonosas de los hongos filamentosos (figura 9.1). Se anotarán las características más importantes de las colonias bacterianas y fúngicas, y se realizará un estudio microscópico de cada una de ellas.



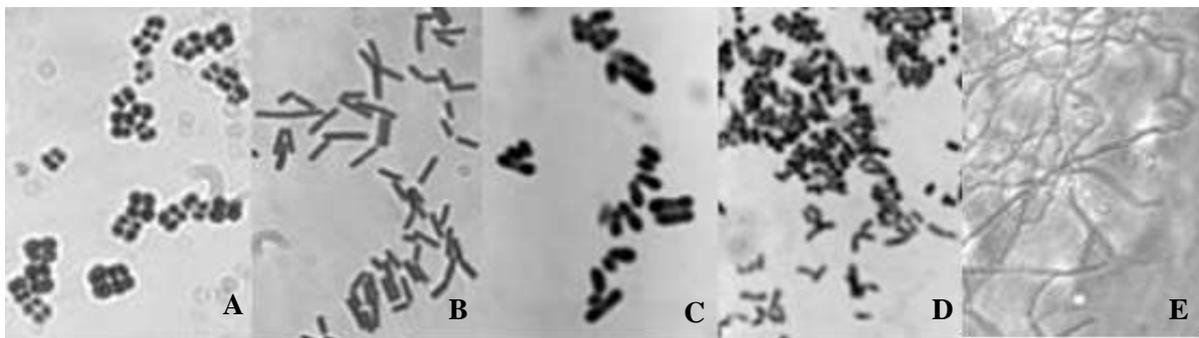
Empleando la fórmula de Omeliansky se cuantifica el nivel de contaminación microbiana en el ambiente evaluado.

Se contabilizan todos los desarrollos microbianos que se observen en las placas expuestas durante un tiempo determinado.

En base a las especificaciones de la OMS, se define si el ambiente está contaminado o no.

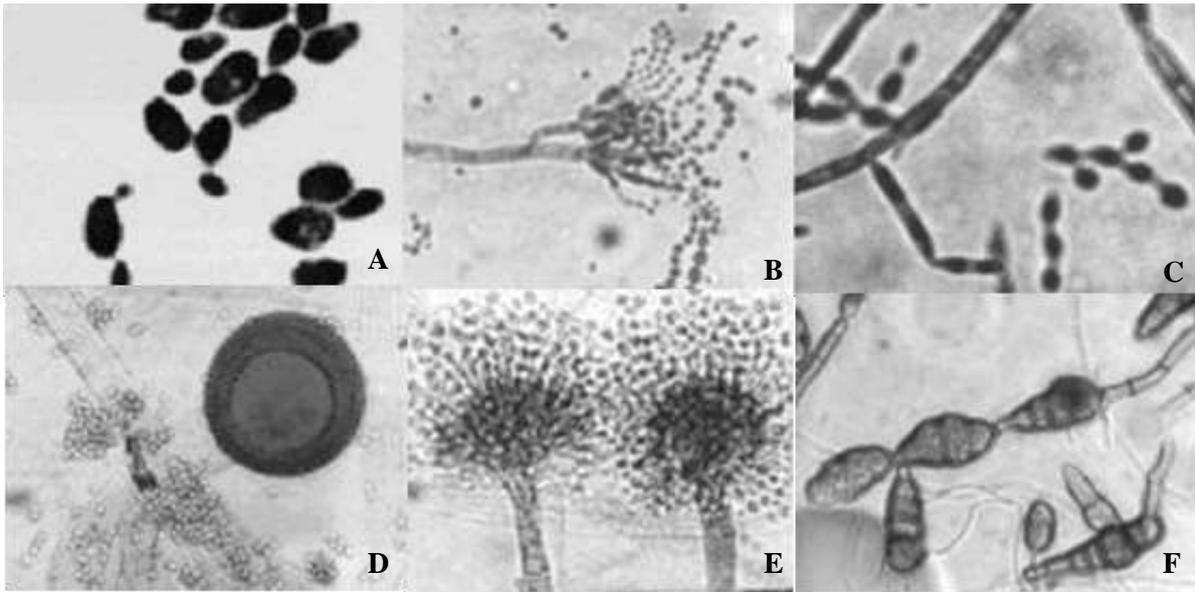
**Figura 1.** Control microbiológico ambiental. Aspecto típico de una placa de sedimentación por gravedad mostrando la diversidad microbiana de un ambiente.

La *observación microscópica de las colonias bacterianas* se realizará mediante una tinción de Gram. Se observará todo tipo de microorganismos, con predominio de cocos y bacilos esporulados Gram positivos, frecuentemente dispuestos respectivamente en sarcinas y en cadenas (Figura 9.2). Los bacilos irregulares que se observaran, tienen pared de Gram positivos, pero se decoloran fácilmente y en las preparaciones aparecerán como Gram negativos o teñidos de forma irregular, en bandas o en los extremos. Estos bacilos son muy pleomórficos unos tienen forma de maza, se agrupan en empalizada o recordando letras chinas; otros poseen un ciclo de crecimiento de bacilo a coco y algunos originan filamentosos.



**Figura 2.** Morfología de algunas bacterias comunes en el aire al microscopio óptico. A. *Micrococcus*. Tinción de Gram (obj. 100x). B. Bacilos regulares (*Bacillus*) en tinción Gram (obj.100x). C y D. Bacilos irregulares: Corineformes (C) y *Arthrobacter* (D). Tinción de Gram (obj. 100x). E. Actinomiceto. Montaje con azul de lactofenol (obj. 40x).

La *observación microscópica de hongos filamentosos* se realizará mediante montaje con azul de lactofenol. Para ello, se apoya una tira de cinta adhesiva transparente sobre el micelio, con el fin de que las hifas y esporas queden adheridas. Se deposita una gota de azul de lactofenol en el centro de un portaobjetos y se adhiere la cinta con el micelio. El color azul facilita la visualización del micelio en fresco (Figura 9.3).



**Figura 3.** Morfología de hongos al microscopio óptico. A. Levaduras en tinción con cristal violeta (obj. 100x). B. *Penicillium*. Montaje con azul de lactofenol (obj. 40x). C. *Cladosporium*. Montaje con azul de lactofenol (obj. 40x). D. *Mucor*. Montaje con azul de lactofenol (obj. 40x). E. *Aspergillus*. Montaje con azul de lactofenol (obj. 40x). F. *Alternaria*. Montaje con azul de lactofenol (obj. 40x).

## **Desarrollo Práctico N° 9**

### **CONTROL MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL**

#### **Consignas:**

1. Realizar el control microbiológico bacteriano empleando una placa de PCA, Agar nutritivo o Agar Tripticasa Soya. PH del medio 6,8 a 7,2, neutrófilo.
2. Realizar el control microbiológico fúngico empleando una placa de Hongos y Levaduras, Sabouraud, Agar papa dextrosa o equivalente suplementado con algún antibacteriano, como Cloranfenicol, rifampicina. PH del medio 5,4 a 6,2, acidófilo.
3. Recuento e interpretación de los resultados

#### **Materiales necesarios**

Asa de siembra  
Mecheros  
Placa de Petri con agar PCA  
Portaobjetos  
Colorantes para tinción simple y de Gram  
Solución de azul de lactofenol azul de algodón  
Cinta adhesiva transparente  
Microscopio y aceite de inmersión

#### **Actividades**

1. Llevar la placa cerrada, con cuidado de que no se abra durante el transporte, al ambiente cuya carga microbiológica se desee evaluar.
2. Retirar la tapa y dejar la placa abierta, durante 30 a 60 minutos, en un lugar representativo de dicho ambiente.
3. Pasado este tiempo, cerrar la placa e incubarla a la temperatura adecuada en función del tipo de microorganismos que se desea evaluar.

En caso de una evaluación micológica se incuban las placas a 25 – 30°C a durante 2 a 5 días.  
Posición de la placa de Petri: tapa hacia arriba.

En caso de una evaluación bacteriológica, se incuban las placas a 35 – 37°C durante 24 a 72 horas. Posición de la placa de Petri: tapa hacia abajo.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANMAT. Ministerio de Salud de la Nación (2003). Farmacopea Argentina. 7a edición. Volumen I. Buenos Aires. Argentina. Imprenta del Congreso de la Nación. Capítulo 1020. Buenas Prácticas de Fabricación y Control. Argentina.
- Bogomolova E. & Kirtsideli I. (2009). Airborne fungi in four stations of the St. Petersburg Underground railway system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(2), 156-160.
- Borrego Alonso, S., y Perdomo Amistad, I. (2014). Caracterización de la microbiota aérea en dos depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(3), 182-187.
- D'Aquino, M. (1999). Saneamiento. Higiene y Sanidad. Ediciones Hector A. Macchi. Argentina.
- De la Rosa, M. C.; Ullán, C.; Prieto, M. P.; Mosso, M. Á. (2000). Calidad microbiológica del aire de una zona limpia en una industria farmacéutica. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. Vol. 66, No 2.
- Estados Unidos. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. (2010). *Farmacopea de los Estados Unidos* 30 Formulario Nacional 25 (USP 30 NF 25). Washington D.C., Estados Unidos: Junta Directiva de la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. Vol. 1, Capítulo <1116> Evaluación Microbiológica de Cuartos limpios y otros Ambientes controlados.
- Martinez, S. V. (2018). Síndrome del Edificio Enfermo y presencia de hongos en ambientes internos como factor de riesgo biológico. Tesis de grado Farmacéutico. Universidad nacional de Misiones.
- Medvedeff, M.G., Bargardi, S, Jerke, G; Horianski, M.A.; Amer, L. (2006) Guía de Trabajos Prácticos. Catedra de Microbiología e Inmunología. 1° Parte. Editorial Universitaria de UNaM. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones.
- Vazquez, A; Denoyo C. (2017) Monitoreo Ambiental. Cap IV.10 en *Manual de Microbiología Aplicada a las industrias farmacéuticas, cosmética y de productos médicos*. Buenos Aires. Argentina. Asociación Argentina de Microbiología. División de Alimentos, medicamentos y cosméticos. Subcomisión de Buenas Práctica.

---

Profesora responsable, 1° edición 2006: Dra Jerke Gladis.

Profesora responsable, 2° edición 2019: Dra Jerke Gladis.

## Trabajo Practico N° 10

### MICOLOGÍA

#### OBJETIVOS

- Valorar la importancia del estudio micológico
- Conocer las técnicas de manejo de cepas fúngicas: cultivo, subcultivo e identificación
- Reconocer y caracterizar géneros de hongos ambientales mediante la observación macro y microscópica

#### INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos:

- Eucariotas
- Aeróbicos
- Heterótrofos: carecen de clorofila.
- Osmótrofos: se alimentan por absorción.
- Oligotrofos: bajos requerimientos nutricionales: saprófito/ simbioses/ parásitos
- Reproducción: sexual y asexual.
- Pared celular que contiene derivados celuloideos y quitina, glucopeptidos y mananoproteínas.
- Ergosterol en su membrana celular
- No móviles generalmente.
- Son cosmopolitas.
- Temperatura de desarrollo: los hay que pueden desarrollar entre 0-60°C. La T° óptima de desarrollo de los ambientales es entre 25-28°C
- Microscópicos y macroscópicos

#### 10.1. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS HONGOS

Los hongos forman parte de procesos benéficos para el hombre:

- Primeros descomponedores de la cadena alimentaria.
- Comestibles: Champiñones, fermentaciones (cerveza, vino, pan, queso roquefort, queso camembert, salsa de soja, otros).
- Sustancias químicas útiles: Ácido cítrico, ácido gálico (tintas), resinas, hormonas, vitamina D.

- 🍄 Enzimas de elevada especificidad: Amilasa, pectinasas, proteasas.
- 🍄 Antibióticos.
- 🍄 Biorremediación.

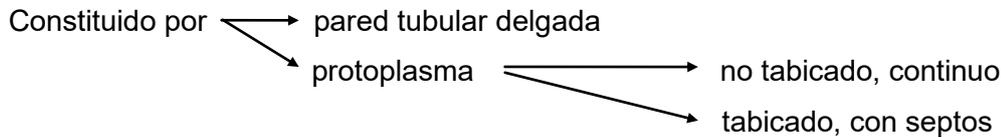
Y los hongos participan también en procesos perjudiciales para el hombre causando:

- 🍄 Micosis: Enfermedades producidas por hongos: superficiales, cutáneas, subcutáneas, sistémicas y oportunistas.
- 🍄 Micotoxicosis: Producidas por la ingestión de metabolitos secundarios tóxicos biosintetizados por hongos.
- 🍄 Micetismo: Ingestión de setas venenosas.
- 🍄 Alergia por hongos.
- 🍄 Enfermedades de cultivos vegetales.
- 🍄 Deterioro de alimentos

## 10.2. CARACTERES GENERALES

### *Estructuras somáticas*

- **Hifa** (gr. hyphae: tejido): Unidad estructural de los hongos, un filamento tubular.



- **Micelio** (gr. myke: seta, hongo): Conjunto de hifas que constituye el cuerpo del hongo. Que puede ser micelio de fructificación y micelio vegetativo que favorece la nutrición.
- **Esporas**: Son unidades de propagación producidas por la mayoría de los hongos y sirven para producir nuevos individuos de la misma especie.

### *Estructuras reproductivas*

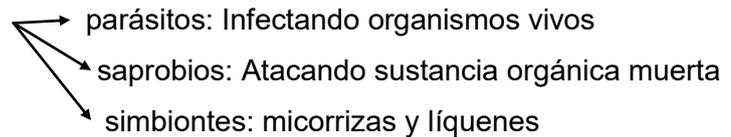
Reproducción es la formación de nuevos individuos que tienen todas las características de la especie.

- **Asexual** (somática o vegetativa): No incluye la unión de núcleos, células sexuales u órganos sexuales. Puede ser por: Fragmentación del soma, fisión, gemación, producción de conidias, etc.
- **Sexual**: Requiere la unión de dos núcleos compatibles. Consta de tres fases: plasmogamia, cariogamia, meiosis.

La plasmogamia reúne dos núcleos haploides en una célula; la cariogamia los reúne en uno diploide, el núcleo; y la meiosis restablece la condición haploide en los cuatro núcleos que resultan de ella.

#### *Nutrición y crecimiento*

Los hongos obtienen su alimento como



Requieren:

- **Hidratos de carbono:** Glucosa, sacarosa, maltosa, etc.
- **Nitrógeno:** A partir de sustratos orgánicos o inorgánicos, sintetizan sus propias proteínas.
- **Minerales:** C, O, H, N, P, K, Mg, S, B, Mn, Cu, Mo, Fe, Zn.
- **Vitaminas:** Algunos deficientes en tiamina y biotina.

Los excesos de nutrientes almacenan como glucógeno o en forma de gotitas de aceite.

#### *Temperatura de crecimiento*

La temperatura óptima oscila entre 25 °C y 28 °C. La mayoría crecen entre 0 °C y 35 °C.

### **10.3. AISLAMIENTO DE HONGOS DEL MEDIO AMBIENTE**

La importancia de reconocer los hongos ambientales (sus esporas se encuentran como aeronavegantes en el ambiente), es que pueden crecer sobre medios inoculados con distinto tipo de materiales procedentes de lesiones humanas, alimentos, o bien pueden contaminar un cultivo puro.

Los contaminantes comunes del ambiente más frecuentemente observados son: Hongos basales, Mucorales y levaduras.

Debido a que el objetivo de la taxonomía moderna es comprender las relaciones evolutivas de los organismos reflejadas en sus genomas, los taxónomos de la década de 1990 comenzaron a aplicar técnicas moleculares para resolver linajes fúngicos entre organismos eucariotas. Como resultado, la clasificación filogenética molecular de cada filo fúngico ha estado proliferando durante los últimos 15 años.

Por lo que el **Reino Fungi** se divide en los hongos basales y el subreino Dikarya

A su vez de los hongos basales aparece el subphylum: Mucorales y en el subreino Dikarya los ascomicetes y basidiomicetes.

## 10.4. DESCRIPCIÓN DE LOS PRINCIPALES CONTAMINANTES FÚNGICOS AMBIENTALES

### 10.4.1. HONGOS BASALES / ASCOMYCETES

Se incluyen todos aquellos hongos que poseen micelio septado, se conoce su forma asexual o anamorfa. Cuando se les conoce la fase sexuada o teleomorfa la mayoría se encuentran ubicados dentro de los *Ascomycetes*.

En esta clase se clasifican la mayoría de la especies fúngicas de interés como importantes contaminantes de los alimentos, muchos de los cuales son capaces de elaborar y acumular metabolitos secundarios tóxicos o micotoxinas.

Son saprófitos pero entre ellos se encuentran algunos que son parásitos y causan daño a vegetales, animales y al hombre. Poseen micelio septado. La propagación tiene lugar por medio de conidios, elementos de propagación asexuales, inmóviles. Son de tamaño y formas distintas que pueden formarse individualmente, sincrónicamente o en cabezas características. Las hifas fértiles se denominan conidióforos.

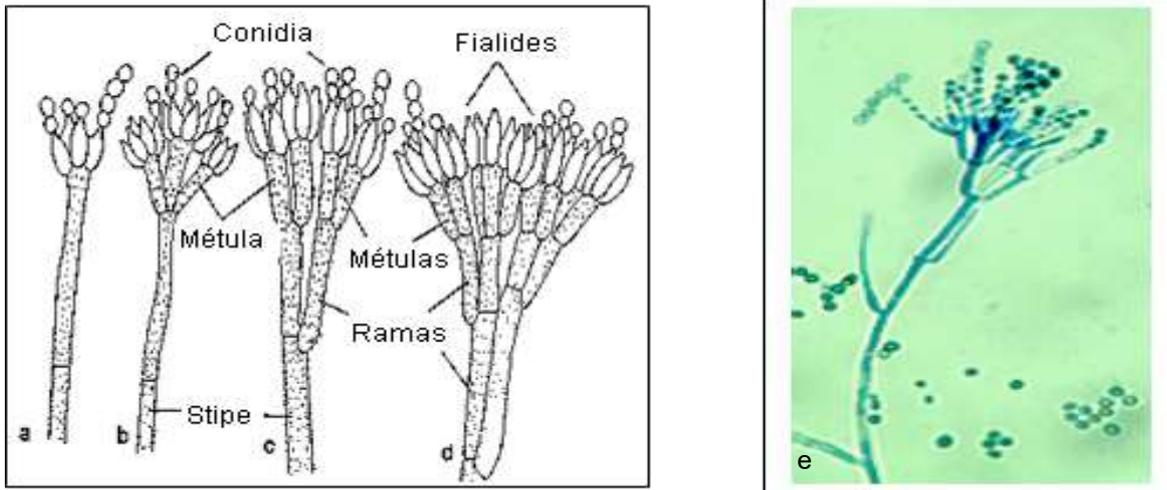
La mayoría esporulan adecuadamente en agar Sabouraud, Czapeck, extracto de malta, incubados a 25 - 28 °C durante 7 - 10 días.

Los géneros más frecuentes son: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Escopulariopsis*, *Trichotecium*, *Fusarium*, etc.

- ***Penicillium***

*Observación macroscópica:* La colonia compacta de crecimiento lento (28 mm de diámetro en 8 días), es al principio blanca, pero después toma color verde azulado y aspecto muy polvoriento debido a la abundante producción de conidios a partir del micelio aéreo.

*Observación microscópica:* Las hifas portadoras de conidios forman el pincel o cepillo. Los conidios aparecen en cadenas no ramificadas y parten de los extremos de los esterigmas los cuales se hallan dispuestos en verticilio, en los extremos de pequeñas pirámides o métulas que nacen de las ramas, del conidióforo (Figura 10.1).

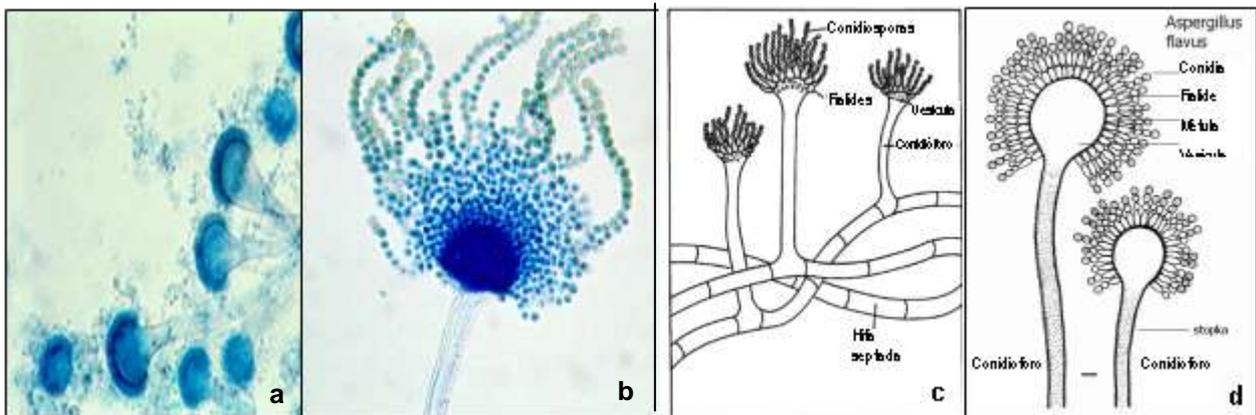


**Figura 10.1:** *Penicillium*: a) Monoverticilados, b) Biverticilados, c - d) Terverticilados y e) Fotomicrografía.

- ***Aspergillus***

*Observación macroscópica:* La colonia crece rápidamente (50 mm. de diámetro en 8 días), es al principio blanca variando la pigmentación posteriormente de acuerdo a la especie. Por ejemplo: en el *Aspergillus seccion nigri* se torna negra; en el *Aspergillus seccion fumigati* se torna verdegrisácea, etc (Figura 2).

*Observación microscópica:* La estructura portadora de conidios es una hifa alargada, no tabicada ni ramificada, que nace de una célula pie, en el micelio. Se ensancha en el extremo formando una vesícula, productora de esterigmas (disposición que varía de acuerdo a la especie). En el *Aspergillus seccion nigri* y *Aspergillus seccion flavi* los esterigmas cubren totalmente la vesícula y en el *Aspergillus seccion fumigati* cubren la mitad de la vesícula. los conidios parten de los extremos de los esterigmas, formando cadenas no ramificadas (Figura 10.2).

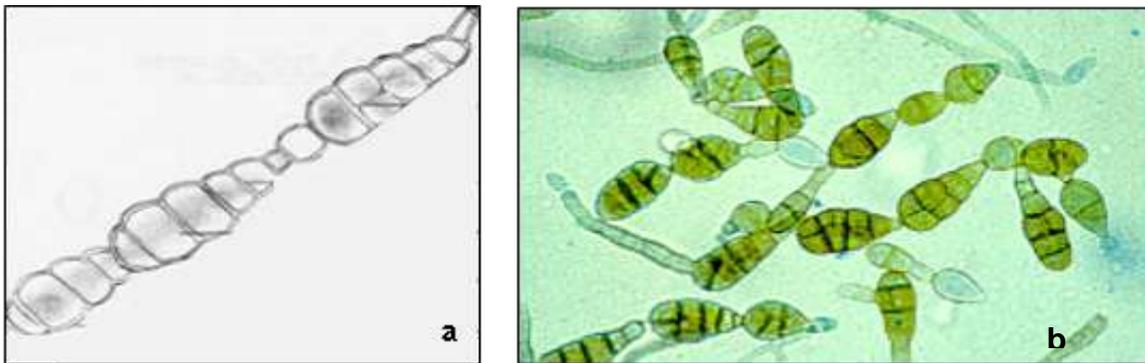


**Figura 10.2:** *Aspergillus*: a y b) Fotomicrografías, c) *A. seccion fumigati* d) *A. seccion flavi*

- **Alternaria**

*Observación macroscópica:* La colonia de crecimiento rápido (40 mm de diámetro en 4 días), desarrolla un micelio corto, gris al principio, después negra con periferia grisácea. El reverso de la colonia es negro.

*Observación microscópica:* A partir de los extremos de los conidióforos se producen los conidios muriformes típicos en cadena, de color oscuro y con tabicaciones longitudinales y transversales. Cualquier célula del conidio puede producir un tubo germinal (Figura 10.3).

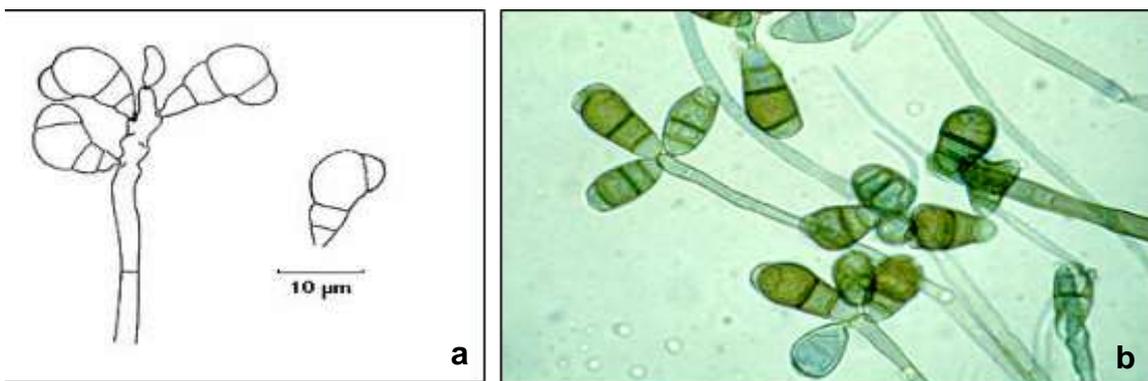


**Figura 10.3:** *Alternaria*: a) Esquema y b) Fotomicrografía.

- **Curvularia**

*Observación macroscópica:* Semejante al anterior.

*Observación microscópica:* Posee conidios pardos con tabicaciones transversales (Figura 10.4).



**Figura 10.4:** *Curvularia*: a) Esquema y b) Fotomicrografía.

- **Scopulariopsis**

*Observación macroscópica:* Colonia de crecimiento lento (30 mm. de diámetro en 9 días), es al principio membranosa, rugosa y sin vellosidades, hasta que aparecen hifas aéreas y conidios que dan al cultivo aspecto polvoriento y color pardo claro.

*Observación microscópica:* Las hifas portadoras de racimos de conidios se parecen superficialmente al pincel del *Penicillium*. Los esterigmas, que sostienen cadenas no ramificadas de conidios de pared rugosa, pueden agruparse en las ramas de un conidióforo corto (Figura 5b) o aparecer aisladas a lo largo de las hifas aéreas (Figura 1.5c). Característicamente los conidios se vuelven más grandes a medida que se alejan de la célula conidiógena. Los conidios tienen forma característica de limón (Figura 10.5a).

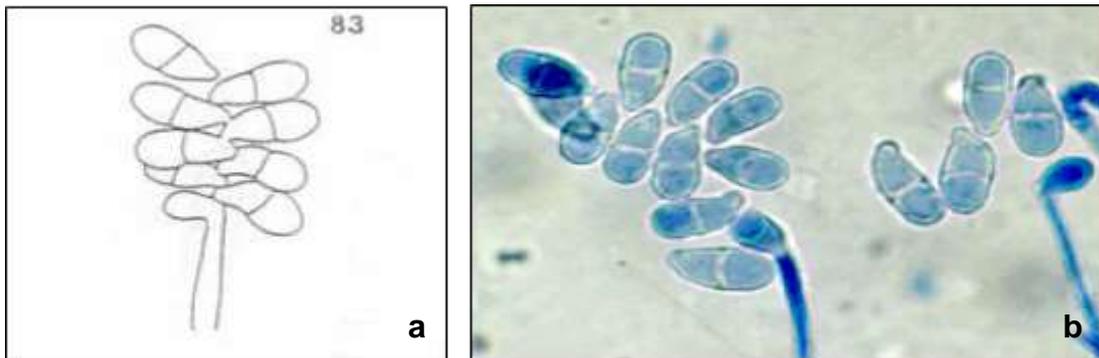


**Figura 10.5:** *Scopulariopsis*: a) Esquema, b y c) Fotomicrografía.

- **Trichotecium**

*Observación macroscópica:* Hongo de crecimiento rápido (70 mm. de diámetro en 9 días) que produce micelio aéreo algodonoso blanco que gradualmente toma color rosado.

*Observación microscópica:* Conidióforo no ramificado, largo, delgado, portadores en su extremo de racimos de conidios bicelulares, piriformes de paredes lisas (figura 10.6).

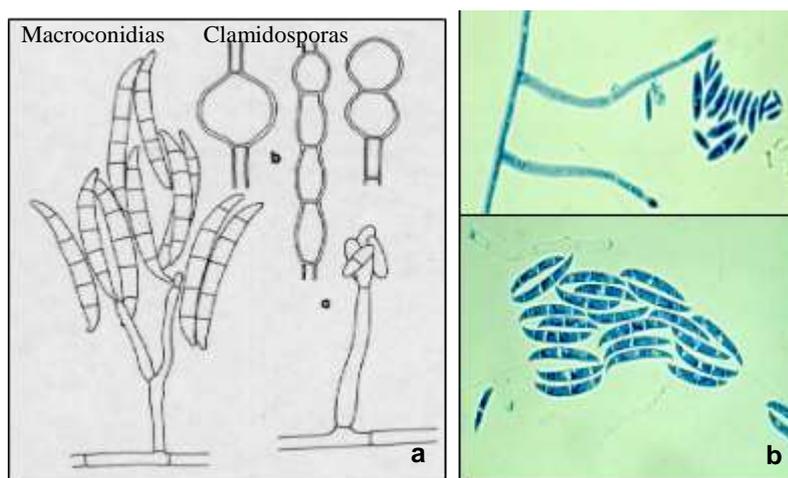


**Figura 10.6:** *Trichotecium*: a) Esquema y b) Fotomicrografía.

- ***Fusarium***

*Observación macroscópica:* Hongo de crecimiento rápido, al principio blanco algodonoso, pero rápidamente algunos desarrollan color rosa intenso en el centro y rosado claro en la periferia.

*Observación microscópica:* Ramas cortas de hifas dan origen a conidios verticilados de los cuales parten conidios multitabacados, largos en forma de hoz o de media luna, terminados en punta, típico del género (Figura 10.7).

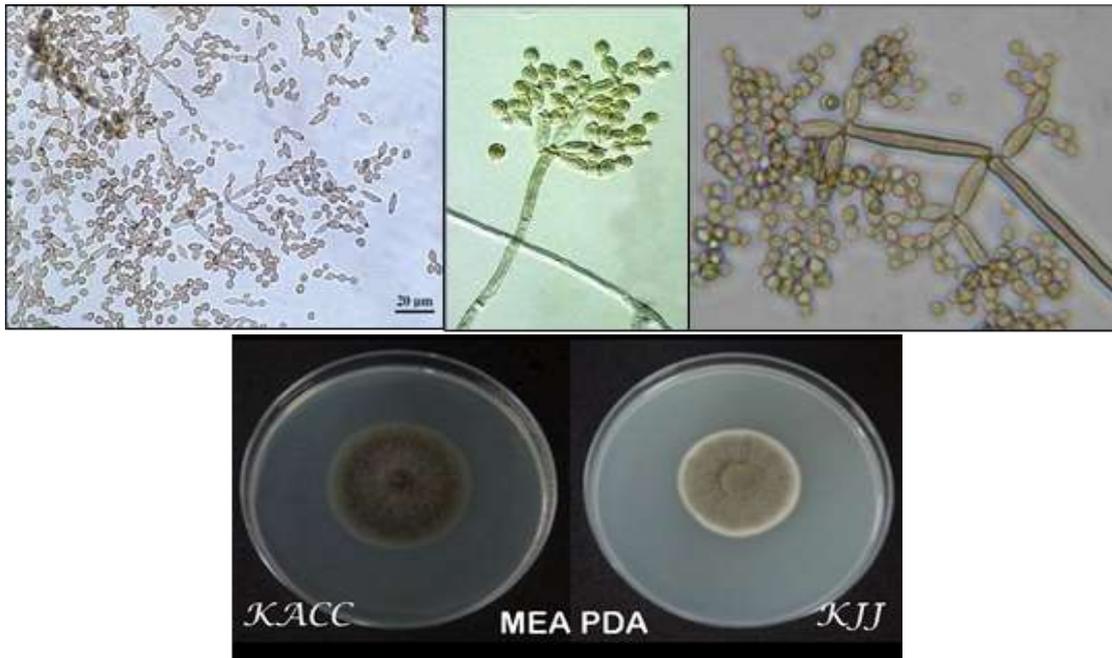


**Figura 10.7:** *Fusarium*: a) Esquema y b) Fotomicrografía.

- ***Cladosporium***

*Observación macroscópica:* Hongo de crecimiento rápido, de aspecto aterciopelado, puede presentar colores que van desde el azulado o verde petróleo en el anverso (semejando colonias de *Penicillium*), algunas veces marrón oscuro pero que siempre son negros en el reverso. Son contaminantes comunes del suelo, plantas y elementos de deterioro.

*Observación microscópica:* Ramas cortas de hifas dan origen a cadenas de conidios ovalados a esferoidales que característicamente se disponen en aspecto arborescente (Figura 10.8).



**Figura 10.8.** *Cladosporium*: Fotomicrograffas (arriba). Aspecto de las colonias en MEA y PDA.

#### 10.4.2. MUCORALES

Habitan en el agua, en el suelo, sobre cualquier sustrato que contenga sustancia orgánica (cáscara de frutas, etc.) o se encuentran constituyendo parte de la micoflora atmosférica de diversos hábitats. Pueden ser parásitos y saprobios, algunos de gran importancia económica, como ciertas especies que son utilizadas en las industrias de las fermentaciones, mientras que unas pocas ocasionan enfermedades en los animales y en el hombre. **Se caracterizan por poseer un micelio cenocítico (no tabicado).** El único septo que se forma de manera constante es el que separa los órganos especializados como el esporangio y zigosporas del micelio estéril. En algunos géneros aparecen septos en el micelio, pero éste no es un carácter constante y es poco frecuente.

La reproducción asexual tiene lugar por medio de esporangiosporas que se origina de forma endógena a partir de esporangios globosos o piriformes con o sin columela o en merosporangios. Algunos géneros se caracterizan por poseer una apófisis. Otras estructuras son los estolones o hifas especializadas que se adhieren al sustrato por medio de los rizoides.

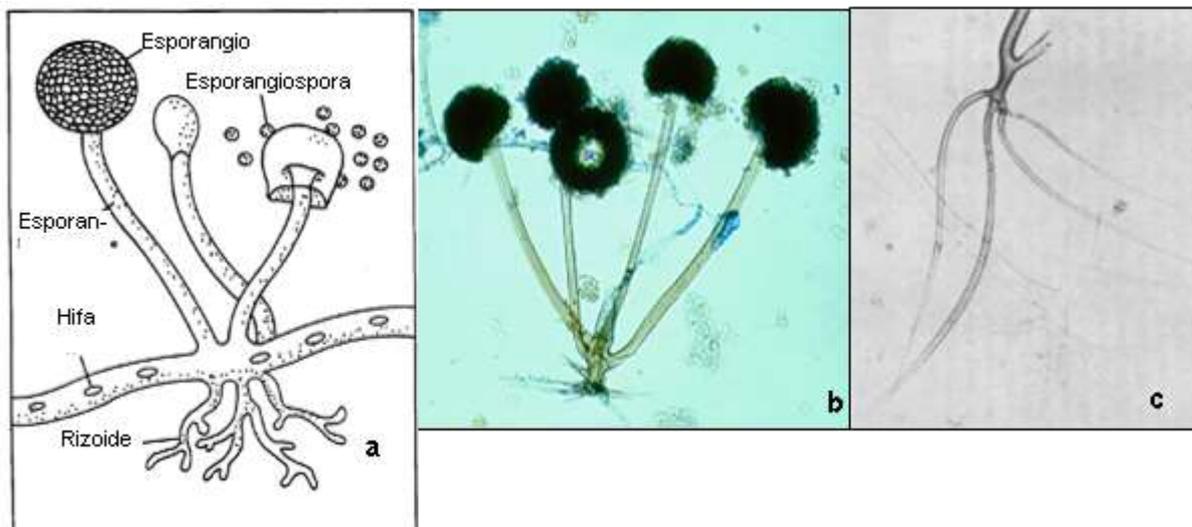
La reproducción sexual tiene lugar por fusión de dos gametangios multinucleados y de ello se origina una zigospora de color amarillento o marrónáceo en ocasiones negruzca, cubierta de espinas u otro tipo de proyecciones externas. Las dos partes de la hifa que sostiene a la zigospora reciben el nombre de suspensores.

Los géneros más frecuentes son: *Rhizopus*, *Lishteiria* (ex *Absidia*), *Mucor*, *Cunninghamella*, *Syncephalastrum*, etc.

- ***Rhizopus***

*Características macroscópicas:* El crecimiento es voluminoso y rápido, filamentososo, grueso y lanoso. Micelio blanco que se torna gris esparcido con puntos negros o marrones (esporangios).

*Características microscópicas:* El micelio es no septado y sin color, el cuerpo de fructificación consiste en largos tallos (esporangióforos) sobremontados por esporangios esféricos. Los esporangios son de paredes oscuras, cuando maduran presentan una columella y están llenos de esporas hialinas esféricas. Los esporangióforos no son ramificados y aparecen en racimos en disposición opuesta al rizoide a lo largo de una rama horizontal (estolón) (Figura 10.9).

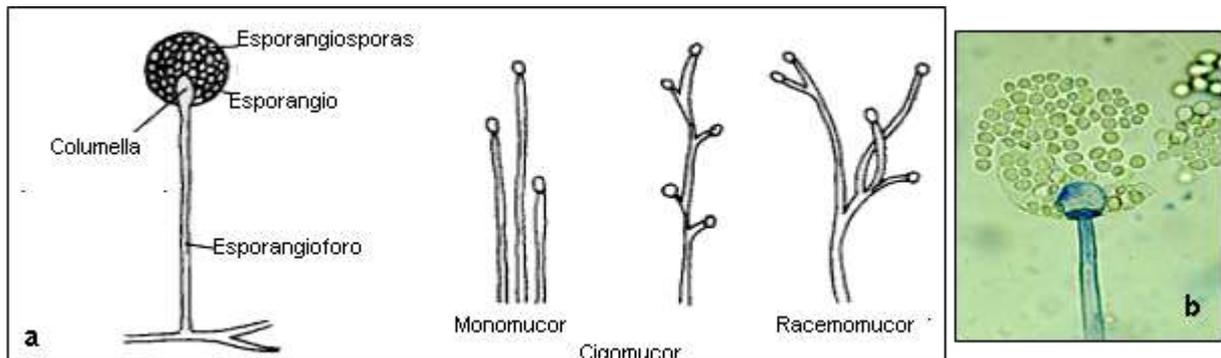


**Figura 10.9.** *Rhizopus*: a) Esquema y b) Fotomicrografía, c) Fotomicrografía de un rizoide.

- ***Mucor***

*Características macroscópicas:* La colonia es de crecimiento rápido llenando la caja de Petri en 5 a 7 días con un micelio aéreo, esponjoso que es primero blanco y luego se torna gris o marrón.

*Características microscópicas:* El micelio es no septado, sin color y sin rizoide (el micelio viejo puede mostrar una irregularidad en las paredes que semejan septas). El esporangióforo se eleva del micelio grueso y erecto como un tallo. Puede o no estar ramificado con un esporangio esférico terminal con muchas esporas. La columella está siempre y puede quedar remanentes de la pared esporangial después que las esporas han salido liberadas, formando el collarete. Las zigosporas son producidas por algunas especies (Figura 10.10).

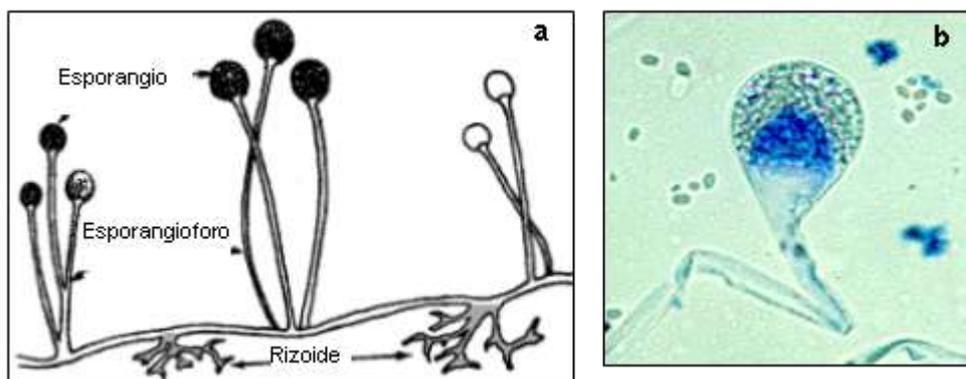


**Figura 10.10.** *Mucor*: a) Esquema y b) Fotomicrografía.

- ***Lishteiria***

**Características macroscópicas:** Colonia blanca al principio, luego gris pálido, vellosa y de crecimiento muy rápido, prospera más que la mayoría de los hongos en los medios bacteriológicos.

**Características microscópicas:** El género difiere en varios aspectos del *Rhizopus*. Los rizoides y estolones no están claramente diferenciados; los esporangióforos nacen de los estolones y no de los puntos de unión de los rizoides. Los esporangios son relativamente pequeños y piriformes, el rango más característico de todo es la presencia de una apófisis bien definida, es decir un pie o una prominencia infundibuliforme del esporangio en el punto en que se unen las paredes de éste y la columella (Figura 10.11).



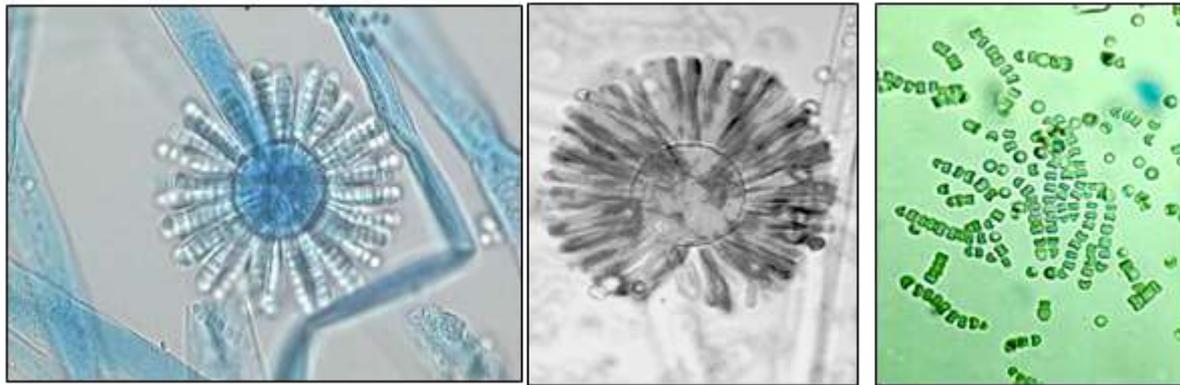
**Figura 10.11.** *Absidia*: a) Esquema y b) Fotomicrografía.

- ***Syncephalastrum***

**Características macroscópicas:** La colonia es de crecimiento rápido y exuberante, semejando a la colonia de *Rhizopus nigricans*.

**Características microscópicas:** Las esporas se forman en largos esporangios tubulares radiados desde un engrosamiento en el extremo del esporangióforo. Cuando se hacen preparados y se

observan a pequeño aumento las cabezas muestran un sorprendente parecido a las del *Aspergillus*. A gran aumento se ven las cadenas de esporas encerradas en membranas tubulares, y si sigue el desarrollo de las estructuras de esporulación se observarán que las esporas se forman exactamente como un tipo normal de esporangio (Figura 10.12).

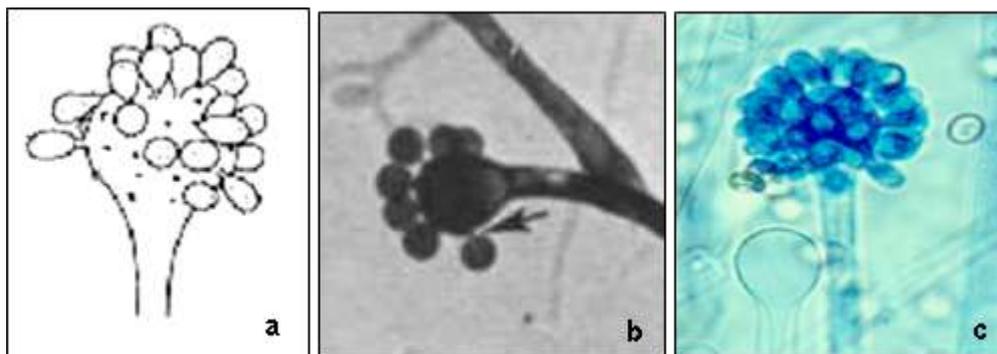


**Figura 10.12.** Fotomicrografías de *Syncephalastrum*.

- ***Cunningamella***

*Características macroscópicas:* Micelio blanco, flocoso, ligeramente engrosado y ramificado.

*Características microscópicas:* Las hifas son ligeramente engrosadas, el eje principal así como las ramas laterales terminan en cabezas esféricas ornamentadas con pequeñas hinchazones que son el punto de inserción de los conidios. Los conidios son esféricos u ovals frecuentemente con una irregularidad externa, la membrana externa es espinosa y con agujas de cristal. Las clamidosporas son globosas intercalándose en el micelio (Figura 10.13).



**Figura 10.13.** *Cunningamella*: a) Esquema, b y c) Fotomicrografía.

## **Practica de Laboratorio N° 10**

### **MICOLOGÍA**

#### **Consignas**

1. Observación de las características macroscópicas de las colonias fúngicas
2. Reconocimiento de colonias de mohos y levaduras
3. Identificación genérica de colonias de mohos (hongos filamentosos)

#### **Materiales necesarios**

- Asa en L
- Mecheros
- Placa de Control ambiental en H y L
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Solución de azul de lactofenol azul de algodón
- Cinta adhesiva transparente
- Microscopio y aceite de inmersión

#### **Actividades**

1. Recuento de contaminantes ambientales: Bacterias en placas de PCA y hongos en placas de H y L.
2. Observación y reconocimiento de hongos contaminantes comunes provistos por la cátedra. Describir y esquematizar.
3. Observación y clasificación genérica de contaminantes comunes aislados en sus placas de control ambiental.
4. Volcar los resultados en la tabla en pizarra: resultados de los recuentos y el nombre de las cepas fúngicas identificadas.

#### **Consideraciones generales**

Las técnicas que se usan en micología son en general similares a las utilizadas en bacteriología. Hay sin embargo diferencias que son importantes de puntualizar:

- En todo momento tanto por la protección de los estudiantes como por la seguridad y mantenimiento de los cultivos puros, es necesario trabajar bajo condiciones de esterilidad.

- Se usa un ansa con alambre de nicrón cuyo extremo puede adoptar la forma de aguja, o forma de L, gancho, especialmente para transferir la fase micelial. Un par de agujas para apartar las densas masas de micelio y separar partes sobre el portaobjeto antes de la observación microscópica.
- Es preferible usar tubos de ensayo de diámetro considerable a tubos angostos. Esto permite una base grande de agar en el fondo del tubo, la que evita que se deseque el medio durante la incubación de varias semanas a que se somete.
- Se debe trabajar sobre una mesada perfectamente libre de otro material, previamente desinfectada con solución antiséptica de preferencia que contenga yodo. Se aconseja colocar sobre la misma, en el área de trabajo papel de filtro u otro absorbente con desinfectante.
- Trabajar siempre al lado de un mechero, si es posible dentro de cabinas de seguridad biológica y evitar todo tipo de corriente de aire que favorezcan la dispersión de las esporas y la contaminación de los cultivos.
- Finalizada la tarea se debe descartar el material en la misma solución antiséptica, solución de fenol al 10% o en su defecto en una solución de agua-lavandina.

*Recordar la desinfección de las mesadas una vez concluido el trabajo.*

## **Examen de los cultivos**

- **Morfología macroscópica**

Observar la morfología de las colonias después de un período de 1 semana, tomando nota de las siguientes características:

- Tipo de hongo: Hongo filamentoso, Hongos mucorales, levaduras
- Tamaño de la colonia (en mm)
- Pigmentación (Color de Colonia: anverso, reverso y del medio de cultivo)
- Aspecto/Textura (Aterciopelada, algodonosa, pulverulenta, granular, cremosa etc)
- Topografía general (plana, levantada, regular, cerebriforme, etc.)

Cuando se describe la morfología macroscópica de una colonia, siempre deben especificarse el tipo de medio y las condiciones ambientales de los cultivos (temperatura y tiempo de incubación).

Los datos se pueden volcar en el siguiente cuadro.

**Cuadro Nº 1.**

*Descripción macroscópica de las colonias fungicas.*

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS	Tipo de hongo:
TAMAÑO DE LA COLONIA	Diámetro (mm)
COLOR	Colonia: Reverso: Pigmento del medio:
ASPECTO/TOPOGRAFIA	

• **Morfología microscópica**

**Hongos filamentosos.** Usando técnica estéril, remover una pequeña cantidad de la colonia en estudio con el ansa. Colocar el material sobre una gota de solución fisiológica (SF) o lactofenol azul y separar en partes si es necesario. Colocar el cubreobjeto y observar con objetivo seco de menor aumento, cuando se ha localizado lo que se desea observar, usar el objetivo seco de mayor aumento. Si hay esporas o fructificaciones es posible identificar el cultivo por esta observación microscópica. A menudo hay que recurrir a otros procedimientos como ser:

- Preparación de microcultivos, para determinar la relación de las esporas con los conidióforos.
- Usar medios especiales para inducir esporulación o producir una particular estructura o un especial tipo de cultivo.
- Usar pruebas fisiológicas o nutricionales para determinar las características fisiológicas del hongo aislado que permitan su identificación.
- En algunos casos es necesario hacer pruebas de patogenicidad en animales para identificar un cultivo.
- Se puede recurrir a distintas técnicas de coloraciones, realizando previamente la fijación del extendido.

**Cuadro Nº 2. Descripción microscópica.**

Nombre	Tipo de micelio	Tipo de esporo	Forma de fructificación


**Cuadro modelo:**

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	HONGO FILAMENTOSO		HONGO LEVADURIFORME
MICELIO	HIALINO	SEPTADO	OBSERVACIÓN DE BLASTOCONIDIAS, SEUDOHIFAS Y CLAMIDOSPORAS
		ASEPTADO	
	DEMATIACEO	SEPTADO	
		ASEPTADO	
	GRUESO		
DELGADO			
PRODUCCIÓN, TAMAÑO Y DISPOSICIÓN DE LAS CONIDIAS	DEPENDIENDO DE LA ESPECIE		

Cuadro 2. Descripción microscópica de los hongos

**Hongos levaduriformes**

Preparación de los extendidos para la observación microscópica de levaduras:

- Tomar con un ansa ojal, previamente esterilizada a la llama una pequeña porción de la colonia y extenderla sobre una gota de SF, agua o lactofenol azul, en el portaobjeto.
- Colocar un cubreobjetos y realizar la observación a bajo aumento.

Se puede realizar tinción de Gram de los extendidos de las colonias levaduriformes de la misma manera que se procede con las bacterias. Los hongos levaduriformes son Gram (+).

**PREPARACIÓN EN FRESCO**

Este procedimiento es el que se utiliza en la mayoría de los laboratorios, ya que las muestras se preparan con facilidad y rapidez y además permite identificar muchas de las especies de hongos más frecuentes. El mayor inconveniente de la observación en fresco es que se puede alterar el ordenamiento característico de las esporas al presionar con el cubreobjetos, por lo que este procedimiento no es válido en los casos en que es necesario conocer la disposición de las esporas.

Se realiza empleando el procedimiento descrito a continuación:

1. Seleccionar una colonia aislada.
2. Calentar el asa en aguja (rojo incipiente) para esterilizar, dejar enfriar.
3. Extraer un fragmento del micelio e la colonia.

4. Depositar el fragmento extraído sobre un portaobjetos en el cual, previamente, se ha depositado una gota de azul de lactofenol.

5. Cubrir con un portaobjeto y presionar suavemente para dispersar la colonia; de esta forma, la muestra está disponible para su observación al microscopio. Inicialmente en 10X para reconocer la muestra y luego pasar a 40X para observar detalles del micelio y la fructificación.

#### PREPARACIÓN CON CINTA DE CELOFÁN ADHESIVA

Es un método rápido para observar microscópicamente los mohos sin alterar el arreglo de sus conidias. Una de las desventajas es que si la cinta transparente no se presiona con suficiente firmeza sobre la superficie de la colonia, la muestra no es adecuada, ya que al no quedar bien adherida la cinta, las esporas o las hifas no se pueden identificar.

En los casos en que mediante este método no se observen esporas deberá realizarse la preparación en fresco.

El procedimiento se lleva a cabo como sigue:

1. Colocar una gota de azul de lactofenol sobre una lámina portaobjeto.
2. Cortar un pedazo de cinta adhesiva transparente (2 a 3 cm) y fijarlo a un asa en aguja o entre los dedos pulgar e índice.
3. Colocar la cinta sobre la superficie de la colonia de moho, haciendo presión.
4. Colocar la cinta sobre la lámina portaobjetos.
5. Observar al microscopio inicialmente en 10X para reconocer la muestra y luego pasar a 40X para observar detalles del micelio y la fructificación.

También se realizan **técnicas de microcultivo** (Método de Riddel): También llamado cultivo en lámina. Es útil para la identificación de especies de hongos filamentosos.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca Salat, L. Diagnóstico de Laboratorio de Micología. Departamento de Patología y Producciones Animales. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 1992.
- Deacon, J. Introducción a la Micología Moderna. Departamento de Microbiología. Universidad de Edimburgo. Limusa. Noriega Editores. 1993.
- Guía de Trabajos Prácticos. Cátedra de Micología.* Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Editorial Universitaria de Misiones. 2005.
- Manual de trabajos prácticos de Micología médica.  
<https://es.scribd.com/doc/249106366/MANUAL-DE-TRABAJOS-PRACTICOS-DE-MICOLOGIA-MEDICA>.
- Medvedeff, M.G., Bargardi, S, Jerke, G; Horianski, M.A.; Amer, L. (2006) *Guía de Trabajos Prácticos. Catedra de Microbiología e Inmunología. 1º Parte.* Editorial Universitaria de UNaM. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones.
- Piontelli, E; Toro, MA. Manual de Identificación para Microhongos Comunes en Alimentos. Cátedra de Micología. Escuela de Medicina. Universidad de Valparaíso. Chile. 2015.
- Winn W. C., Allen S. D., Janda W. M., Koneman E. W., Procop G. W., Schrenckenberger P. C. y Woods G. L. (2008). *Koneman. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas en color.* Edición 6ª. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.

---

*Profesora responsable, 1º edición 2006: Dra Medvedeff Marta G.†*

*Profesora responsable, 2º edición 2019: Bqca Esp. Chade Miriam E..*

## ANEXO 1.

### REACTIVOS PARA COLORACIONES MICROBIOLÓGICAS

#### 1.1. COLORANTES PARA COLORACIÓN DE GRAM:

A continuación, se detallan la composición y modo de preparación de los productos/colorantes empleados en la tinción de Gram:

##### → **Cristal Violeta (Colorante primario):**

- ◆ Cristal violeta 2,0 gr
- ◆ Etanol 20,0 ml
- ◆ Oxalato de NH<sub>4</sub> 0,8 gr
- ◆ Agua destilada 100,0 ml

*Modo de preparación:*

I- Cristal violeta

*Solución A*

Cristal violeta 20 gr  
Alcohol etílico 200 ml

Mezclar y disolver

*Solución B*

Oxalato de amonio 0,8 gr  
Agua destilada 80,0 ml

Mezclar y disolver

- Agregar la solución A a la solución B
- ◆ Conservar durante 24 hs.
- ◆ Filtrar antes de su empleo

##### → **Iodo de Gram: Mordiente**

- ◆ Ioduro de potasio 2,0 gr
- ◆ Iodo (cristales) 1,0 gr
- ◆ Agua destilada 300,0 ml
- ◆ Moler las sustancias sólidas en unos 20 ml de agua
- ◆ Agregar el resto líquido
- ◆ Filtrar en frasco color caramelo
- ◆ Guardar a resguardo de la luz, desecharlo cuando el color comienza a aclararse

##### → **Solución Decolorante:**

- ◆ Acetona 100,0 ml
- ◆ Etanol, 95% 400,0 ml

→ **Colorante de contraste o secundario**

- ◆ Safranina o Fucsina basica 2,5 gr
- ◆ Etanol 95% 100,0 ml

Disolver el colorante en un pequeño volumen de etanol, completar a volumen.

**1.2. COLORANTES PARA ZIEHL NEELSEN**

Solución 1: carbolfucsina / fucsina fenicada

Fucsina básica	4 gr
Fenol	8 ml
Alcohol absoluto	20 ml
Agua destilada	100 ml

Disolver la fucsina básica en el alcohol y agregar lentamente el agua mientras se agita, luego agregar el fenol fundido.

Solución 2: decolorante: Alcohol-ácido

Alcohol 95<sup>a</sup> 485 ml

Ácido clorhídrico puro 15 ml

Solución 3: solución de azul de metileno al 0,3%

## Anexo 2

### COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO COMERCIALES MÁS UTILIZADOS

#### 1. CALDO NUTRITIVO

- Cloruro de sodio-----3 g
- Extracto de carne ----- 3g
- Peptona-----5g
- Agua destilada-----1000cc

#### 2. AGAR NUTRITIVO

- Extracto de carne ----- 3g
- Peptona----- 5g
- Agar-----12 a 15 g
- Agua destilada-----1000cc

#### 3. AGAR CLDE

- Peptona-----4 g
- Tripteína-----4 g
- Extracto de carne -----3 g
- L(-)Cisteína----- 0,128 g
- Lactosa-----10 g
- Azul de bromotimol---0,020 g
- Agar-----12 g
- Agua destilada-----1000 ml

#### 5. AGAR EMB SEGÚN LEVINE. (Agar Eosina Azul de Metileno Lactosa)

- Peptona de Carne----- 10g
- Lactosa----- 10g
- Fosfato dipotásico-----2g
- Eosina amarillenta-----0,4g
- Azul de Metileno-----0,065g
- Agar-----13,5g
- Agua destilada-----1000 ml

#### 5. AGAR SANGRE

- Medio base -----100 ml
- Sangre entera----- 5 – 10 %

El medio base a ser utilizado en la preparación de agar sangre y agar chocolate puede ser agar Columbia, agar tripteína soja o agar nutritivo.

La sangre se añade al agar estéril y enfriado a 45-50 °C, evitando la formación de burbujas. Se prefiere la sangre de carnero, conejo y caballo, que ofrecen buenas reacciones hemolíticas. La sangre humana procedente de banco tiene el inconveniente de contener citrato que puede inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, anticuerpos, agentes antimicrobianos y glucosa que falsea la reacción de hemólisis.

Preparación. Puede realizarse de dos maneras:

1. Directamente en placas de Petri:

a. Fundir el agar esterilizado en tubos (20 ml) a baño María y dejar enfriar a 45–50 °C.

- Colocar 2 ml de sangre en una placa estéril y verter el agar en la misma; inmediatamente y con suavidad realizar movimientos circulares con la placa a fin de obtener una mezcla homogénea, cuidando de no mojar la tapa ni de hacer espuma.

- Dejar solidificar

- Secar la superficie del medio en estufa a 37 °C 20 minutos (Placa invertida).

2. En erlenmeyer:

a. Fundir el agar esterilizado en erlenmeyer a baño María y dejar enfriar a 45 – 50 °C.

- Añadir 5–10 % de sangre y homogeneizar inmediatamente con suavidad para obtener una mezcla homogénea, evitando la formación de burbujas.

- –Distribuir en placas. Dejar solidificar y secar la superficie del medio en estufa a 37 °C 20 minutos (placa invertida).

## 6. **AGAR CHOCOLATE**

- Agar base -----100 ml

- Sangre entera----- 5 – 10 %

### Preparación

Una vez fundido el agar base esterilizado, y enfriado a 45 °C, agregar la cantidad de sangre necesaria y colocar en baño de agua. Elevar la temperatura a 80 °C, mantener en estas condiciones durante 5 a 10 minutos hasta color típico agitando continuamente sin hacer burbujas. Enfriar a 45 °C y distribuir en placas de Petri. Dejar solidificar y secar la superficie del medio en estufa a 37°C 20 minutos (placa invertida).

*Nota: Las placas de agar sangre y/o chocolate, de no usarse inmediatamente, se conservarán en la heladera a temperatura de refrigeración.*

### Anexo 3

## PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO NATURALES

### 1. AGAR HARINA DE MAIZ:

Se utiliza para la producción de pseudohifas y clamidosporas de especies de Candida

- Harina de maíz-----40g
- Agar-----20g
- Agua destilada-----1000 ml

#### Preparación

- Mezclar la harina de maíz con 500 ml de agua y calentar a 65 °C durante 1 hora. Homogeneizar periódicamente para evitar la aglomeración.
- Filtrar a través de una gasa y luego papel de filtro hasta obtener un filtrado claro
- Reponer el agua evaporada y agregar el volumen restante de agua.
- Ajustar a pH 6,6-6,8.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### 2. AGAR PAPA DEXTROSA: Empleado para favorecer la esporulación de mohos

- Papas----- 250g
- Glucosa-----20g
- Agar-----15g
- Agua destilada-----1000 ml

#### Preparación

- Lavar la papa (no pelar), cortar en pequeños trozos y colocar en erlenmeyer con 500 ml de agua. Calentar a baño María 30 a 45 minutos.
- Al mismo tiempo en otro erlenmeyer fundir agar en 500 ml de agua
- Filtrar la papa a través de una gasa y agregar el filtrado al erlenmeyer con el agar fundido. Comprimir la gasa para escurrir el agua retenido en la pulpa de papa.
- Agregar la glucosa, mezclar y completar con agua al volumen total.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### 3. AGAR PAPA-ZANAHORIA: Se utiliza para facilitar la esporulación de mohos

- Papa-----20 g
- Zanahoria----- 20 g
- Agar----- 20 g

- Agua destilada-----1000 ml

#### Preparación

- Lavar la papa y la zanahoria (no pelar), cortar en pequeños trozos y colocar en erlenmeyer con 500 ml de agua. Calentar a baño María 30 a 45 minutos.
- Filtrar la papa a través de algodón y luego con papel de filtro. Agregar el agar y ajustar el agua a 1000 ml.
- pH 6,6 -6,8
- Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- 

#### **4. LACTRIMEL (LAC)**

Medio utilizado en la identificación de hongos Dermatofitos.

Miel de abejas -----40 ml

Harina de trigo-----10 g

Leche -----200 ml

Agar ----- 20 g

Agua destilada c.s.p.----- 1000 ml

Disolver los ingredientes calentando hasta ebullición, distribuir 7 ml por tubo de ensayo y autoclavar a 121 ° C 15 minutos. Enfriar los tubos en posición inclinada.

#### **5. AGAR SEMILLA DE GIRASOL (AGAR DE STAIB O AGAR NIGER SEED)**

El medio de cultivo contiene ácido cafeico contenido en el extracto de la semilla de girasol (*Guizzotia abbinica*) que permite detectar la enzima fenol oxidasa desarrollada por *Cryptococcus neoformans*. La reacción enzimática produce melanina, la cual es absorbida por la pared celular del hongo produciendo un color marrón. „

Pesar:

Glucosa----- 1,0 g

Creatina..----- 0,78 g

Agar ----- 18,0 g

Cloramfenicol----- 0,05 g

Extracto de semilla de girasol----- 350 mL

La preparación del **extracto de semilla de girasol** consiste en:

-Pulverizar las semillas de girasol. Pesar 70 g del pulverizado y suspenderlo en 350 ml de agua destilada. Hervir. Filtrar con gasa.

-Agregar los otros componentes. Calentar hasta disolver.

-Distribuir 50–100 ml por frasco. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Mantener en refrigeración con cierre hermético. En el momento de usar, fundir el medio y plaquar. Emplear un control positivo de *Cryptococcus neoformans*, el cual desarrollará una pigmentación marrón y un control negativo de *Candida* spp. que desarrollará de color blanco.

---

*Compaginación general, 2° Edición 2019: Dra Gladis Jerke*

