

UNIDAD 1



PROFESOR SERGIO DAMIÁN ABATE, VET. MAG. DR.

Universidad Nacional de Río Negro. Centro de Investigación y Transferencia (UNRN CONICET) Viedma

Unidad I - Objetivos

Comprender la relación de la microbiología con otras ciencias que constituyen la currícula de la carrera.

Comprender los principales conceptos generales de la microbiología, desde el estudio de la historia de la microbiología, hasta comprender su aplicación en el marco del futuro ejercicio profesional.

Conocer los principios que rigen la dinámica de trabajo en un laboratorio microbiológico, para cada nivel de bioseguridad posible. Incorporar los principios básicos de bioseguridad, tanto para el trabajo en un laboratorio de nivel I (laboratorio escuela) como para el trabajo a campo.

Tabla de Contenido

Unidad I - Objetivos	2
Tabla de Contenido	3
La microbiología y su relación con otras ciencias	4
Microbiología y biología	6
Distribución de los microorganismos en la naturaleza	6
Evolución de la Microbiología como ciencia	7
El microscopio	8
La falsa creencia sobre el origen espontaneo de la vida:	8
el concepto de cultivo puro:	9
Aspectos morfológicos de colonias microbianas	11
Aspectos morfológicos de colonias de hongos pluricelulares (mohos)	13
Teoría del germen de la enfermedad:	14
Los postulados de Koch	14
Aprendiendo a controlar a los microorganismos: la pasteurización	15
Las vacunas: en qué consisten y como se generaron	16
Antisépticos, desinfectantes y antimicrobianos	17
Los virus, la genética y la biología molecular:	18
Bases de la epidemiología	20
Los mapas epidemiológicos	20
Las tasas, herramienta fundamental en epidemiología para “medir” las enfermedades	24
La cadena epidemiológica para comprender los mecanismos de transmisión de un patógeno	24
El laboratorio microbiológico	26
Bases para un laboratorio de microbiología de nivel I de bioseguridad	26
Normas de construcción:	26
Equipamiento:	27
Materiales de laboratorio:	29
Principios de bioseguridad	31
La bioseguridad en laboratorios de microbiología	32
La bioseguridad fuera de los laboratorios de microbiología	33
Características de los microorganismos vinculadas al proceso de infección/enfermedad, que condicionan las medidas de bioseguridad requeridas en los laboratorios para poder trabajar con ellos:	34
Glosario de bioseguridad	36
Nivel de bioseguridad 1	38
Nivel de bioseguridad 2	39
Nivel de bioseguridad 3	39
Nivel de bioseguridad 4	39
Correctas prácticas en un laboratorio microbiológico	40
Lavado de Manos:	42
TRANSPORTE DE MATERIAL INFECCIOSO DE RIESGO BIOLÓGICO:	44
Cuestionario de autoevaluación:	45

La microbiología y su relación con otras ciencias

La Microbiología es la ciencia que estudia a los microorganismos (m.o.): seres vivos invisibles a simple vista. Estudia su morfología, composición química, fisiología y metabolismo, su reproducción, la interacción entre microorganismos y su inserción y función en los ecosistemas, y los diferentes métodos para realizar estos estudios en los laboratorios microbiológicos. En el caso de la microbiología médica, es motivo de interés el estudio de los mecanismos que poseen los m.o. para agredir a sus hospedadores, conocidos como “factores de virulencia”. En el caso de la microbiología agrícola y ambiental, es motivo de estudio las interacciones entre diferentes microorganismos y sus funciones ecosistémicas, las alteraciones físicas y químicas que provocan en el medio donde habitan, su distribución en la naturaleza, su relación con seres vivos superiores, y su posible uso benéfico para mejorar los índices de la producción agrícola, control de plagas y enfermedades, y usos tecnológicos (como inoculantes en silos, en aditivos para rumiantes, etc.). En microbiología de alimentos (un área de la bromatología) se estudia la función de microorganismos benéficos, los probióticos y su aplicación en diferentes formulaciones (por ejemplo, el yogurt), así como aquellos microorganismos que generan enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) y los mecanismos físicos y químicos para controlarlos y garantizar la inocuidad alimentaria.

Si consideramos que la célula es la verdadera unidad básica de la vida, podemos comprender que todas las células vivas (bacterianas, integrantes de organismos superiores como animales y plantas) comparten algunas similitudes. Por ejemplo, poseen un material genético (ácidos nucleicos) que mantiene y transmite la información de las capacidades de la célula a las células hijas, y la posibilidad de presentar mutaciones en dicha información, que en oportunidades ofrecerá ventajas evolutivas tanto como en otras puede generar incompatibilidad con la vida y dicha célula mutada no prosperará. Poseen capacidad de reproducirse, de incorporar nutrientes del medio que los rodea, así como de excretar los residuos del metabolismo. Poseen capacidad para reaccionar ante diferentes estímulos físico- químicos ambientales así como estímulos provenientes de otras células: así como las células de un animal superior se comunican estableciendo funciones diferenciales en tejidos que componen los órganos (cada uno con funciones diferentes), las bacterias pueden comunicarse también entre sí, y por ejemplo censar la densidad poblacional mediante procesos como el conocido “quorum sensing”, y en consecuencia modificar su velocidad de multiplicación, aumentándola o disminuyéndola, adaptándose así a variaciones físico químicas de su ambiente.

Los métodos microscópicos complejos, como la microscopía electrónica o la confocal, han permitido conocer la gran complejidad de la organización intracelular, así como las interacciones entre diferentes taxones microbianos cuando crecen en un ambiente determinado. La microscopía electrónica ha permitido conocer, caracterizar y comprender muchas características de los virus, unos organismos mucho más simples que las bacterias: al carecer de citoplasma y muchas enzimas, los virus son incapaces de realizar actividades metabólicas autónomas, debiendo parasitar células vivas para poder multiplicarse, haciendo uso de su maquinaria metabólica para obtener energía, sintetizar proteínas y copiar su ácido nucleico. Esta limitación es motivo por el cual, para muchos investigadores, los virus no son considerados seres vivos; sin embargo, dada su evidente interacción con células vivas

(bacterianas o células de organismos superiores como plantas y animales), a las que puede dañar, matar, o en las que puede inducir mutaciones, en este curso consideraremos a los virus como parte de los microorganismos.

Los microorganismos constituyen sistemas específicos para la investigación desde diferentes enfoques, como el estudio del metabolismo y la fisiología celular, la genética, la interacción con otros organismos y sus funciones ambientales. Se ha conocido mucho sobre la biología celular de organismos multicelulares evolucionados, estudiando dichos fenómenos en células bacterianas usadas como modelo experimental: es más fácil, rápido, económico, y libre de cuestiones éticas, el estudio de la genética en bacterias que en animales superiores: para evidenciar un cambio genético hace falta esperar una generación, que en el caso del ser humano es de 20 años y en el de bacterias como *Escherichia coli* es de 20 minutos.

Al nivel celular, los procesos metabólicos de los microorganismos se rigen por los mismos principios que determinan el metabolismo de células superiores (animales o vegetales): los pasos metabólicos y las enzimas intervinientes en la degradación de la glucosa (por mecanismos aerobios o anaerobios) son similares entre la levadura de cerveza (mientras está fermentando la malta para producir cerveza), la célula muscular de una vaca que se mueve de un lugar a otro, o la hoja de una planta de interés agrícola: en todos los casos se degrada un producto químico de gran energía interna (glucosa) hasta obtener productos de menor energía interna, y la energía diferencial se acumula químicamente como ATP. Algunos microorganismos poseen un metabolismo que se asemeja al de los vegetales: pueden utilizar la energía lumínica mediante el proceso de fotosíntesis (algas verdes), o elementos inorgánicos para producir sus propios elementos orgánicos. Otros microorganismos se asemejan al metabolismo de células animales: deben consumir elementos orgánicos previamente formados, para degradarlos y obtener energía y materia prima para elaborar sus elementos constituyentes: proteínas, ácidos nucleicos, ácidos grasos para formar la membrana citoplasmática, etc.

Es difícil definir el límite exacto del alcance de la microbiología como ciencia biológica, ya que se ocupa del estudio de los microorganismos, unos seres vivos distribuidos por todos los sitios del planeta (desde zonas de hielos eternos hasta el agua termal que fluye de capas profundas del suelo, desde suelos desérticos hasta los fondos de lechos de agua. Considerando la amplia distribución, indudablemente la microbiología debe vincularse con ciencias como la biología en estudios de ecosistemas. A su vez, los microorganismos tienen un papel principal en el mantenimiento del equilibrio biológico de la biósfera, (microorganismos benéficos), pero también pueden dañar seres vivos superiores como animales y vegetales (microorganismos patógenos) por eso la microbiología se vincula con la medicina humana, la veterinaria y la sanidad vegetal. Como los microorganismos forman parte de la materia prima de alimentos, o participan en los procesos de elaboración, pudiendo deteriorarlos o constituir riesgos para la salud de quienes consumen dichos alimentos (personas o animales), la microbiología se vincula con la tecnología interactuando con ciencias básicas como la química y la física.

La permanente evolución de los medios tecnológicos para el estudio de los microorganismos junto al cumulo incalculable de información obtenida, han generado la

partición de la microbiología en áreas temáticas como la bacteriología, la virología, la micología y la ficología. A su vez, algunas de estas áreas temáticas pueden tener orientación médica, ambiental, industrial, de alimentos, etc.

La Microbiología Médica se ocupa sólo de una parte de ese mundo microbiano y es la encargada de estudiar los microorganismos patógenos capaces de producir enfermedades infecciosas. La Microbiología Ambiental y Agrícola se ocupa de las interacciones entre microorganismos del suelo, los sustratos químicos, los factores físicos y las plantas. La degradación de ambientes producto de un incesante desarrollo industrial ha generado un área de investigación: la biorremediación, que se ocupa de intentar reestablecer las características ecológicas de ambientes degradados física y o químicamente. Una forma de biorremediar un ambiente, es mediante el uso de microorganismos capaces de degradar, asimilar o inmovilizar algún elemento que genere desequilibrio ecosistémico, como es el caso de los hidrocarburos, metales pesados, compuestos tóxicos persistentes como los derivados clorados del tipo del PCB y las dioxinas, etc.

Microbiología y biología

Algunos m.o. tienen mayores potencialidades fisiológicas y bioquímicas que algunas células diferenciadas de organismos pluricelulares superiores, como la célula de la piel o una célula de la raíz de una planta. Algunas algas y bacterias sintetizan aminoácidos con los que forman proteínas estructurales y/o enzimas complejas, a partir del nitrógeno atmosférico inorgánico, algo que es imposible para las células de organismos superiores. Por el contrario, las células de organismos superiores requieren aminoácidos o compuestos nitrogenados orgánicos previamente formados. Algunos microorganismos sintetizan todas sus vitaminas, otros requieren que algunas vitaminas les sean suministradas, pero la gran mayoría de las células de organismos superiores requieren vitaminas ya formadas. Revisando los requerimientos nutricionales de varios microorganismos, veremos que algunos son muy sencillos en tanto otros son muy complejos; la creciente complejidad de estos requerimientos es un reflejo de la menor o mayor capacidad de síntesis. Los bioquímicos han tomado microorganismos con diferentes grados de capacidad sintética para investigar los procesos biosintéticos y las enzimas utilizadas en cada uno de ellos.

Distribución de los microorganismos en la naturaleza

Como ya se ha visto, los microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Suspendidos en el aire (solos o adheridos a partículas de polvo), el viento los puede llevar desde la superficie de la tierra hasta las partes más altas de la atmósfera, situación que ha generado una nueva rama de la microbiología: la microbiología del aire, incluso la astromicrobiología, ya que las sondas que viajan a Marte o a la Luna están buscando microorganismos como rastros de vida en todos sus destinos. Otros microorganismos habitan ambientes acuáticos en sus más variadas formas: agua dulce, agua salada, agua termal, etc. Muchos microorganismos originarios de los fondos de lechos de agua pueden encontrarse sobre la superficie de la tierra, transportados por las corrientes de agua (ríos, arroyos) hasta los lagos y otros depósitos de agua. Esta capacidad de diseminarse constituye la base para la propagación de muchas enfermedades: si la materia fecal de un ser humano conteniendo diversos microorganismos (m.o.) patógenos (*Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* o algún virus responsable de enfermedades digestivas) es vertida

sin tratamiento previo a las corrientes de agua de un río, estos agentes productores de enfermedades podrán diseminarse entre sitios distantes, a través de cursos de agua, y así transmitirse de una persona a otra a pesar que ambas no hayan tenido contacto directo. Siempre que existan condiciones propicias para las actividades metabólicas, (humedad, disponibilidad de nutrientes, temperaturas adecuadas para cada taxón microbiano particular), habrá m.o. presentes. El suelo constituye un nicho ecológico crucial para cada ecosistema, y en él los microorganismos se encargan de transformar los diferentes elementos químicos, reciclando material de organismos muertos y dejando elementos disponibles para ser usados en la nutrición de los vegetales.

Los microorganismos se encuentran en los alimentos que consumimos, en la superficie de nuestro cuerpo, en el interior del tubo digestivo, en la nariz y hasta en el aire que respiramos. Los microorganismos que conviven habitualmente con los seres superiores, en contacto con ellos y sin producir enfermedades, son llamados microorganismos comensales y constituyen los llamados “microorganismos residentes” o “microbiota normal”. Estos microorganismos cumplen la función de ocupar un sitio, un nicho ecológico, dificultando así la instalación de algún microorganismo potencialmente patógeno mediante procesos de competencia. En el ambiente también hay microorganismos no patógenos, que en este caso son conocidos como “saprófitos” y cumplen funciones importantísimas para mantener la salud de los ecosistemas. Las plantas conviven con múltiples microorganismos en todas sus partes: desde la raíz hasta la hoja; muchos microorganismos no solamente no enferman a las plantas, sino que son necesarios para mantener la salud de las mismas.

Evolución de la Microbiología como ciencia

La historia de la Microbiología es la relación de los logros de muchos científicos: a lo largo de más de un siglo de método científico aplicado al estudio de los m.o. es verdaderamente inmensa la lista de personalidades y descubrimientos, no obstante, la historia clásica de la microbiología menciona relativamente pocos nombres y acontecimientos relevantes. Muchas contribuciones importantes y sus autores han sido olvidados, ya sea porque sus descubrimientos se han incorporado en una cadena en la que solo quedó visible el producto final, o bien porque el hallazgo de algunos científicos ha llamado poderosamente la atención, desviando la atención de la mayoría de la gente: entre fines del siglo XIX y principios del XX, surgieron aportes importantísimos de la microbiología médica así como de la microbiología ambiental: para el primer caso, tenemos las vacunas desarrolladas por Pasteur que permitían prevenir la rabia (una enfermedad de alta mortalidad), para el segundo caso tenemos los hallazgos de Winogradsky de bacterias del suelo capaces de usar el nitrógeno inorgánico para producir sus propias biomoléculas: los dos hallazgos no han sido aplaudidos con el mismo ímpetu en el momento de su comunicación, no obstante ambos son cruciales para la comprensión y el mantenimiento de la vida tal cual la entendemos en nuestro planeta actualmente.

El microscopio

La Microbiología comenzó, en su primera etapa formal de evolución, cuando el hombre aprendió a pulir piezas de vidrio y lograr ampliaciones de imágenes lo suficientemente importantes como para ver aquello invisible a simple vista. En el siglo XII, Roger Bacon, monje franciscano, filósofo y científico inglés (1220 – 1292), postuló que las enfermedades eran causadas por criaturas vivas e invisibles. Algo de esta hipótesis provenía de algunas teorías griegas. Esta sugerencia también la hizo Fracastorius de Verona dos siglos después que Bacon (1483-1553), pero al no tener evidencias concretas para probar su postulado, el mundo siguió creyendo que las enfermedades se producían por influencias espirituales, astrológicas o miasmáticas.

En 1678 Robert Hooke, astrónomo y matemático inglés (1635 – 1703), vio y describió células en un pedazo de corcho, estableciendo así la prueba de que los cuerpos animales y vegetales, por muy complejos que parezcan, están compuestos por partes elementales repetidas con frecuencia: las células. Esta afirmación se remontaba a la época de los griegos, ya que Aristóteles (tal vez inspirado en Demócrito), describió la estructura celular teórica de las cosas vivas en el siglo IV antes de Cristo. No obstante, Robert Hooke fue quien obtuvo evidencias concretas de la estructura celular en material vegetal. Fue Antoine van Leewenhoek (Holanda: 1632-1723) el primero en comunicar la descripción de la existencia de seres vivos microscópicos en una gota de agua. Leewenhoek era un comerciante con el tiempo libre suficiente como para entretenerse tallando lentes y haciendo microscopios simples (de un solo lente); durante su vida hizo más de 250 microscopios que consistían en lentes de tallado casero montados en un soporte metálico, mediante los cuales pudo lograr aumentos de hasta 200 o 300 veces. Sus descripciones de protozoos fueron tan precisas que muchas de las formas que él vio y describió se pueden reconocer actualmente sin dificultad. Registró cuidadosamente sus observaciones en una serie de cartas a la Real Sociedad Británica: en una de las primeras, (del 7 de septiembre de 1674) describía ciertos “animalculos diminutos” con gran detalle, dejando poca duda de que observó bacterias, hongos y muchas formas de protozoos que hoy en día podemos observar en una gota de agua. El 16 de junio de 1675 informó al examinar un pozo de agua en el que había puesto una pimienta entera el día anterior. “Descubrí en una gota diminuta de agua, una cantidad increíble de los pequeños animalculos de diversas formas y tamaños. Estos se movían flexionándose como una anguila, nadando siempre con la cabeza al frente y nunca primero la cola; estos animalculos nadaban tanto hacia atrás como hacia adelante, aunque su movimiento era muy lento”.

La falsa creencia sobre el origen espontáneo de la vida:

El descubrimiento de los microbios por Leewenhoek aumentó el interés en conocer el origen de la vida, generándose diversas corrientes especulativas. En lo referente a las formas superiores de vida, la explicación griega de que la diosa Gea era capaz de crear personas a partir de piedras y otros objetos inanimados había sido sustituida por la creencia que algún otro dios lo había hecho a partir de la nada misma. Aparecieron defensores y detractores de la teoría de que las cosas vivas podrían originarse espontáneamente, cada uno con una nueva y a veces fantástica explicación o una pizca de prueba experimental.

El concepto de la “generación espontánea” se retornó por última vez por Pouchet, quien publicó en 1859 un extenso estudio donde demostró la generación de cuerpos vivos a partir de materia inanimada. Sin embargo, el tesón y el ingenio de Louis Pasteur (1822-1895 Francia), químico y biólogo, se pusieron al servicio de la verdad. Pasteur llevó a cabo una serie de experimentos que pusieron punto final a la discusión, para ello preparo matraces acondicionándolos de manera especial: luego de colocar caldo de cultivo dentro del matraz, ayudado por el calor del fuego torció la columna del matraz a manera del “cuello de un ganso”. El objetivo de Pasteur era evitar que los m.o. del aire ingresaran al caldo de cultivo que se encontraba, estéril, en el interior del matraz. Habiendo calentado el medio de cultivo hasta esterilizarlo, lo mantuvo al aire, sin tapar, sabiendo que los microorganismos quedarían atrapados en la curva del “cuello de ganso”, sedimentando en el vidrio antes de alcanzar el fondo del matraz. La vida no surgía espontáneamente, a pesar que el matraz tuviera medio de cultivo con nutrientes y la boca del matraz estuviera sin tapar (asegurando el ingreso del aire necesario para la vida): recién cuando Pasteur arrastraba el medio de cultivo hacia la zona de la punta del pico del matraz, comenzaba a contaminarse el medio de cultivo del interior. Pasteur comunicó esos resultados con gran alarde en la Sorbona de París, el 7 de abril de 1864. Sus frascos preparados podían demostrar que la vida no surgía espontáneamente.

el concepto de cultivo puro:

Joseph Lister, médico británico (1827 – 1912), obtuvo en 1878 cultivos puros bacterianos por primera vez. Se entiende por “cultivo puro” a una población de m.o. genéticamente idénticos, derivados clonales de un único m.o. Lister, para conseguirlo, realizó diluciones seriadas en medios de cultivo líquidos, siguiendo estos pasos: partiendo de un líquido que contenía una mezcla de bacterias, lo diluyó en tubos con medio de cultivo estéril tantas veces como fuera necesario hasta que en un tubo no quedara ningún m.o.: el tubo anterior habría de tener solo un microorganismo. Los m.o. derivados de este tubo eran de un solo tipo, idénticas, derivados de divisiones celulares de una única célula madre.

Mientras tanto Koch estaba perfeccionando cuidadosamente sus métodos para el estudio de las bacterias. Comprobó que era más fácil aislar bacterias cuando eran sembradas sobre un medio de cultivo sólido, para ello usó rodajas de papa. Sin embargo, algunos microorganismos no crecían sobre las rodajas de papa, y necesitaban caldos obtenidos por hervor de diferentes elementos que aportaban una gran variedad de aminoácidos y vitaminas. Entonces agregó agar (por recomendación de uno de sus ayudantes) a los caldos de cultivo, logrando solidificarlos. El agar es un hidrato de carbono derivado de algas marinas: muchas bacterias de mar son capaces de degradar el agar, no obstante, las bacterias de la superficie terrestre son incapaces de hacerlo, por lo tanto, el agregado de agar a los medios de cultivo solo cubre el objetivo de poder solidificar un medio de cultivo nutritivo para los microorganismos. La siembra de una muestra por encima de ese medio de cultivo sólido, permite separar a los m.o, distanciándolos lo suficiente como para que cada uno de ellos se multiplique en un punto fijo y genere una colonia separada de las demás. Debido a que las colonias se pueden observar a simple vista (están formadas por millones de derivados clonales de una única célula que les dio origen), a partir de estas

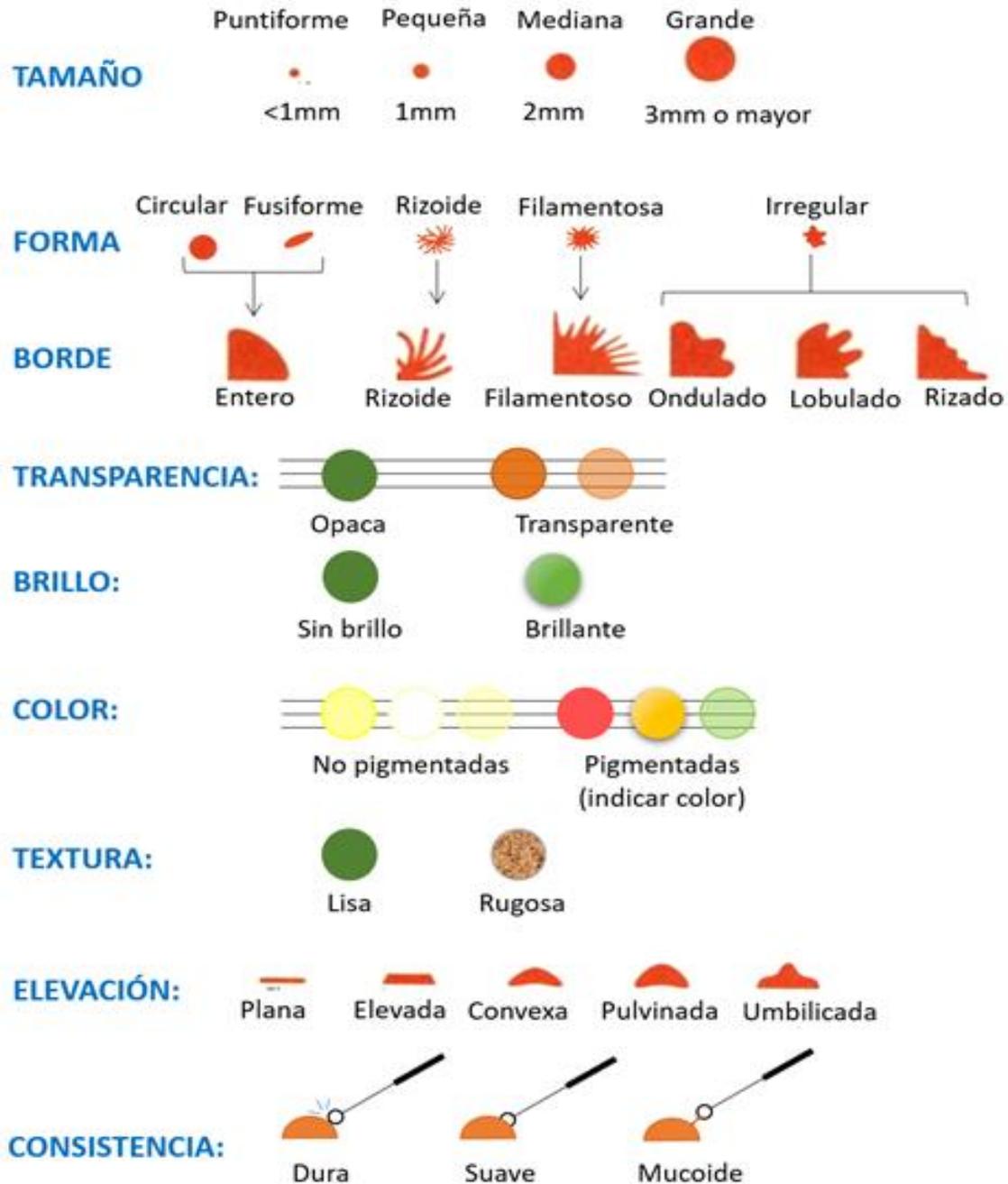
colonias se obtienen fácilmente cultivos puros, El desarrollo de los medios de cultivos sólidos fue de importancia fundamental en el avance de la bacteriología, y debe ser considerado una de las más grandes contribuciones de Koch. No solo facilitó el estudio de una gran cantidad de microorganismos de importancia médica, (al estar en estado "Puro", se pudieron realizar evaluaciones de su patogenicidad), sino que se incorporó un nuevo criterio para la taxonomía microbiana: la característica de la colonia. Generalmente cada grupo bacteriano se caracteriza por un tipo de colonia particular, teniendo en cuenta aspectos visuales a simple vista como el color, tamaño, consistencia, bordes (lisos o aserrados), grado de elevación (planas o elevadas), o la superficie (lisa o rugosa). Indudablemente la microbiología médica se vio muy favorecida por la obtención facilitada de cultivos puros, que pudieron ser evaluados mediante los postulados de Koch, como se comenta a continuación.

La utilidad del estudio de las diferencias morfológicas de las colonias bacterianas, radica en que facilita el aislamiento en pureza a partir de una muestra con una composición mixta (varios taxones) de los cuales pretendemos obtener cultivos en pureza de uno o más de estos taxones. En la imagen que sigue abajo, se observa una placa de petri con diversas colonias de microorganismos del aire del laboratorio. Estos microorganismos fueron capturados dejando la placa de petri abierta durante 10 minutos, y luego puesta a incubar para que los microorganismos crezcan y desarrollen colonias: hay colonias de bacterias y de hongos del aire. En la imagen se observa la maniobra para tocar una única colonia, con el ansa previamente esterilizada, y al abrigo de un mechero que garantiza el trabajo en esterilidad, con el objeto de pasar la colonia a otro medio de cultivo, para obtener así un cultivo puro (actividad que integra parte de los trabajos practicos que se desarrollan durante el dictado de la materia microbiología)

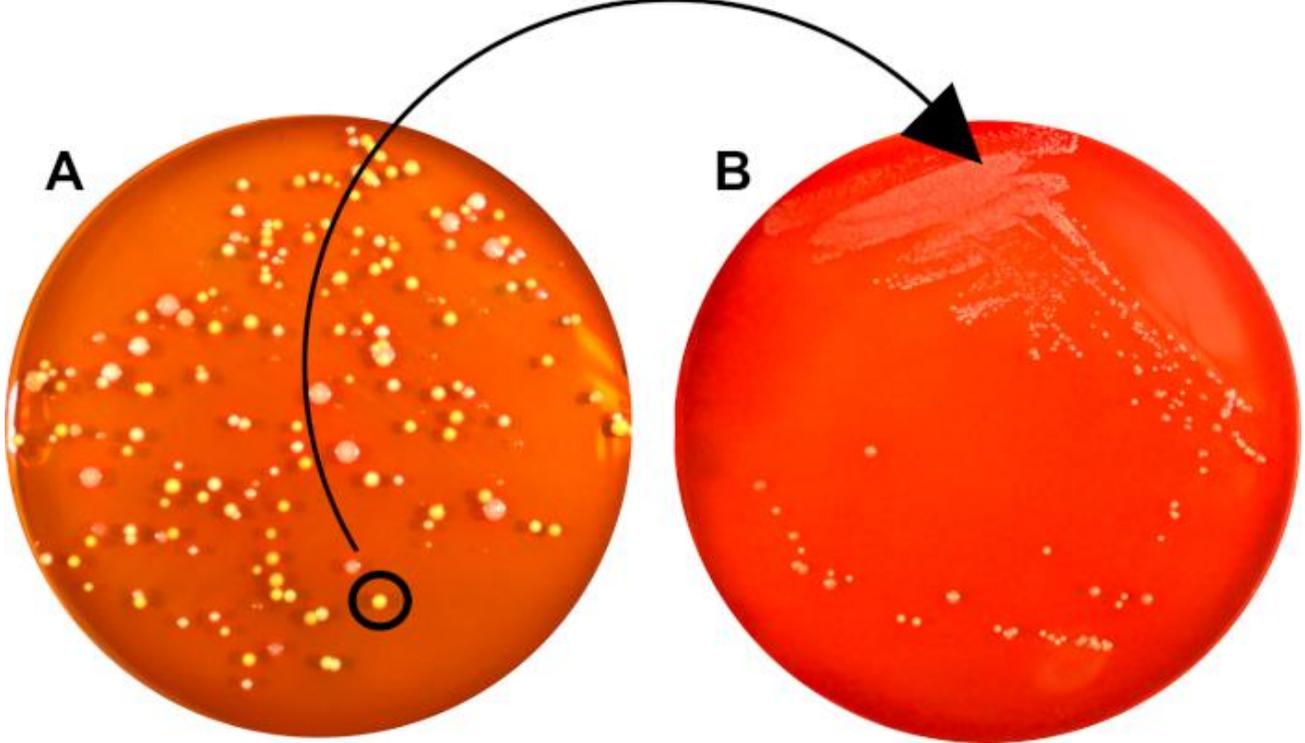


En el siguiente grafico (del Blog: Ding Microbiología en <https://dingmicrolab.wordpress.com/2020/10/12/morfologia-colonial/>) se muestran aspectos morfológicos principales que se pueden observar en las colonias microbianas desarrolladas sobre un medio de cultivo solidificado con agar. Es el método que desarrolló Koch hace más de un siglo, y seguimos usando en la actualidad, por ejemplo, para obtener cultivos en pureza (aislamiento) a partir de muestras donde conviven muchos taxones microbianos diversos.

Aspectos morfológicos de colonias microbianas



En la imagen de abajo se muestra un cultivo mixto (placa de petri A), en el que se selecciona una colonia de interés, se toma una muestra, se siembra en una placa estéril (placa B), y luego de la incubación en esa segunda placa con medio de cultivo SOLAMENTE creció un único taxón microbiano: el derivado de una única colonia: se obtuvo así un cultivo axénico, o un cultivo en pureza, del cual se conoce que está constituido por una descendencia clonal idéntica de una única célula bacteriana, la que le dio origen a la primer colonia de la primer placa de agar.

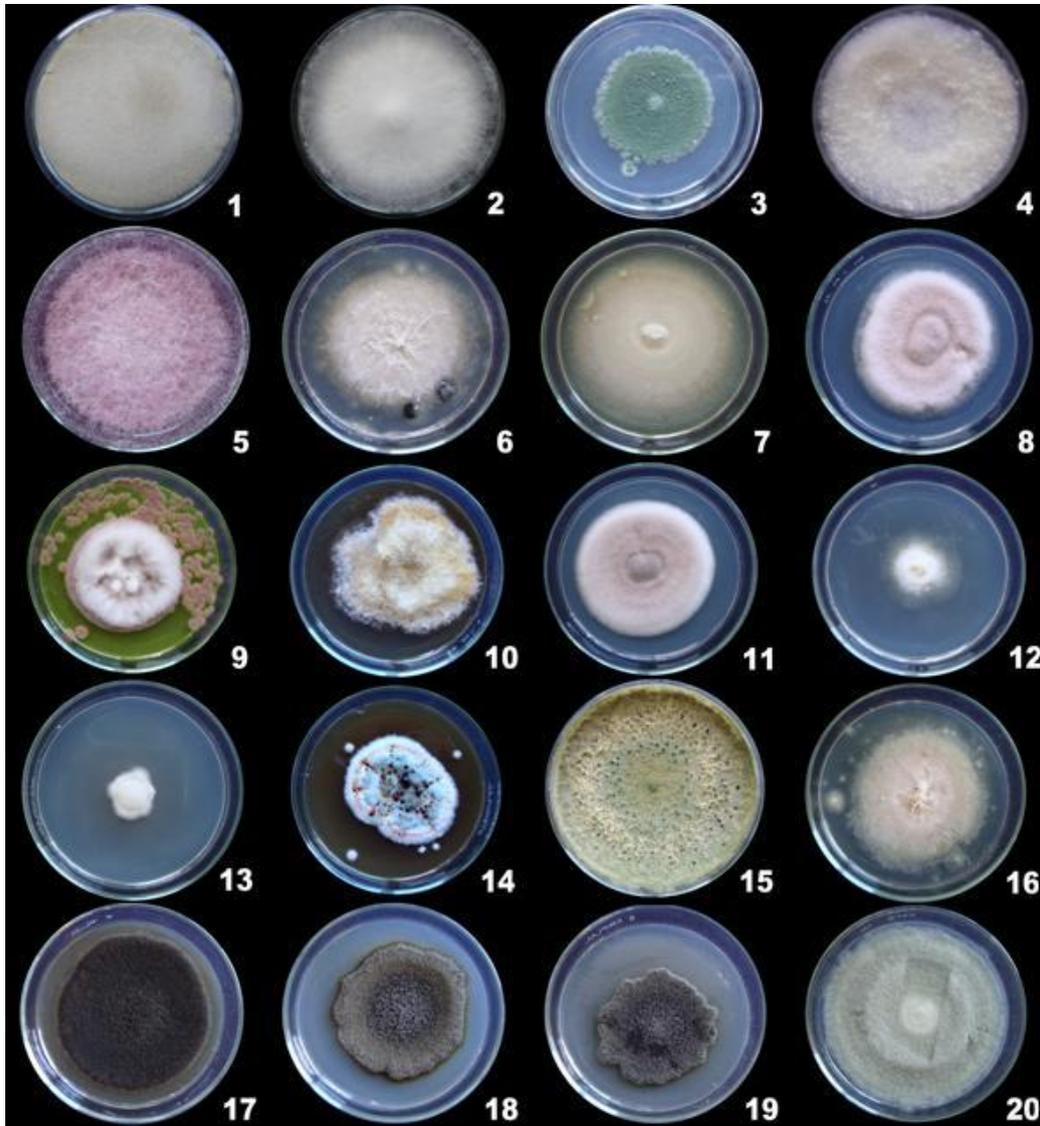


Placa A: cultivo mixto.

Placa B: Luego de haber tomado una colonia de la placa A, sembrado en la placa B, y llevado a incubación, se observa el crecimiento de un cultivo en pureza, derivado de una única colonia de la placa A. Esta es la práctica conocida como aislamiento en pureza.

La utilidad de registrar aspectos macroscópicos diferenciales de colonias sobre medio de cultivo sólido, es mucho más notoria en el trabajo con hongos: los hongos pluricelulares (mohos) presentan más diversidad que las bacterias respecto a color, aspecto, textura, bordes, tamaño, etc., y constituye una herramienta fundamental en la identificación para este tipo de hongos.

Aspectos morfológicos de colonias de hongos pluricelulares (mohos)



En esta Imagen, extraída de una publicación de Pacasa-Quisbert Fernando: “Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K’ipha k’iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha J. Selva Andina Res. Soc. vol.8 no.1 La Paz 2017” (que puede verse en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942017000100002), se aprecia la gran diversidad que presentan los hongos filamentosos (hongos pluricelulares o “mohos”) en las colonias que producen

Teoría del germen de la enfermedad:

Antes que Pasteur demostrara mediante experimentos que las enfermedades pueden ser transmitidas en sus explicaciones sobre las enfermedades del gusano de seda, muchos estudiosos observadores expresaron argumentos sólidos en favor de la teoría del germen de la enfermedad.

Fracastorius de Verona sugirió que la enfermedad podía deberse a organismos invisibles transmitidos de persona a persona. En 1762 von Plenciz de Viena afirmó que ciertos agentes vivos eran la causa de algunas enfermedades diferentes.

Los postulados de Koch

Robert Koch (1843-1910), médico alemán, descubrió a ciertos bacilos típicos (*Bacillus anthracis*) en la sangre de bovinos que habían muerto con síntomas de carbunco. Los cultivó en el laboratorio, examinó microscópicamente los cultivos para asegurarse que solamente contenían *B. anthracis* (es decir, obtuvo “cultivos puros”, con ausencia de cualquier otro microorganismo acompañante, algo que pudo hacer con facilidad al diseñar medios de cultivo sólidos utilizando agar) y los inoculó a otros animales sanos, para ver que ocurría. Lógicamente, los animales inoculados enfermaron de carbunco, a partir de los cuales pudo aislar nuevamente al mismo *B. anthracis* que había inoculado. Con esta metodología demostró la asociación causal de una bacteria con una enfermedad específica en los animales y estableció una serie de premisas, que se conocieron como los postulados de Koch, y que constituyen la base para la investigación en enfermedades transmisibles, así como en la evaluación de eficacia de vacunas.

Los postulados de Koch son 4 y establecen lo siguiente:

1° - Toda enfermedad infecciosa debe estar asociada a un microorganismo. Es decir, en caso de enfermedad se debe encontrar a un microorganismo presente.

2° - Este microorganismo se debe cultivar en el laboratorio en forma de cultivo puro, por aislamiento (algo que Koch facilitó de llevar a la práctica, solidificando los medios de cultivo líquidos, mediante el agregado de agar).

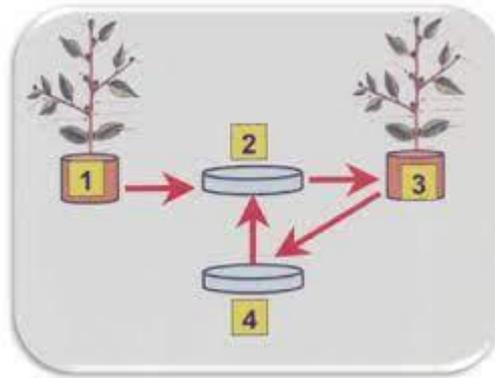
3° - Este cultivo puro, al ser inoculado en otro animal susceptible y sano, debe reproducir los signos de la enfermedad.

4° - A partir del animal infectado experimentalmente, debe poder aislarse nuevamente al mismo microorganismo inoculado originalmente.

Mediante técnicas ideadas por él, Koch estudió el material de pacientes con tuberculosis pulmonar, y luego de una serie de pruebas rigurosas, como lo había hecho con *B. anthracis*, anunció el descubrimiento del microorganismo que causa la tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*, conocido hoy día como bacilo de Koch en honor a este científico y médico que por sus aportes al conocimiento de la tuberculosis recibió el premio Nobel de Medicina en

1905.

Los principios de Koch para demostrar la causalidad de determinada enfermedad (demostrar cual es el verdadero microorganismo causal de una enfermedad contagiosa) se ha aplicado con eficiencia al estudio de enfermedades de las plantas. A partir de una planta con signos de enfermedad (1) se toman muestras y se aísla un microorganismo (2), ese microorganismo se inocula a una planta sana (3), en la cual y luego de la inoculación se reproducirán los signos de la planta enferma, y de esta segunda planta debe aislarse el mismo microorganismo que se aisló en la primer planta enferma (4). Cumpliendo estos pasos, se puede demostrar que la enfermedad de la planta original está producida por el microorganismo que ha sido aislado. De esta forma se han estudiado y comprobado muchísimas enfermedades de plantas, producidas por bacterias, hongos y virus.



Aprendiendo a controlar a los microorganismos: la pasteurización

Louis Pasteur empezó su carrera como profesor de Química de la Universidad de Lille, Francia. Dado que una de las principales industrias de Francia es la producción de vinos, Pasteur estudió los procedimientos que se utilizaban en ella. Observó que la fermentación de las frutas mediante la cual se originaba alcohol, era llevada a cabo por microbios. En los buenos lotes de bebida predominaban ciertos tipos de microbios; en los lotes malos predominaban otros tipos de microbios. Pasteur pensó que debería existir una forma de seleccionar adecuadamente al m.o. responsable de las buenas fermentaciones (o seleccionar negativamente a aquel que se encontraba en los vinos de mala calidad, sin eliminar al mismo tiempo a los microorganismos responsables de las fermentaciones indeseables). El inconveniente se presentaba en que tanto los m.o. responsables de la fermentación deseable, como aquellos que realizaban una fermentación indeseable, se encontraban previamente en los jugos de las frutas, por lo tanto, se presentaba el dilema siguiente: ¿cómo eliminar a los m.o. indeseables, sin eliminar a los necesarios fermentadores y sin alterar las características que los jugos de fruta deben tener para poder hacer el vino? Pasteur ideó un método de eliminación de “microbios indeseables” de los jugos de frutas mediante calentamiento, con la virtud de no alterar las características organolépticas de los jugos: observó que el calentamiento de los jugos de frutas a 62 °C durante 30 minutos tenía la capacidad de eliminar a los m.o. que desarrollaban vinos de

mala calidad sin alterar las características del jugo y sin matar a los fermentadores deseables. Hoy, en honor a su creador, este proceso se conoce como pasteurización, y se lo emplea ampliamente en la industria de los alimentos: leche, jugos, y diversos alimentos son "higienizados", liberados de microorganismos indeseables, mediante un proceso térmico. En la industria láctea es condición partir de leche pasteurizada para su comercialización posterior o elaboración de subproductos, porque de esa manera se asegura la eliminación de algunos m.o. patógenos capaces de generar graves enfermedades como la tuberculosis y brucelosis, endémicas en nuestro país. La pasteurización no es entonces un método de esterilización porque no elimina la totalidad de microorganismos con capacidad reproductiva, sino un proceso de muerte selectiva mediante el cual se elimina una fracción de microorganismos de un producto, manteniendo el resto de la población viva.

Las vacunas: en qué consisten y como se generaron

Un médico inglés llamado Jenner, observó que, ante casos epidémicos de viruela en humanos, los empleados de los tambos no manifestaban la enfermedad. Mirando con atención observó que algunos pezones de los bovinos presentaban signos de viruela, una forma de enfermedad que afecta a los bovinos. Pensó que las personas al establecer contacto con la enfermedad de los bovinos (tamberos) quedaban protegidas para cuando se presentasen brotes de la enfermedad en humanos. Entonces realizó un preparado con material de lesiones de viruela obtenido de bovinos, que inoculó en seres humanos susceptibles de enfermarse, y comprobó que esa inoculación verdaderamente los protegía. Así nació la primera vacuna (el inóculo procedía de un virus de los bovinos, de allí proviene el nombre).

Posteriormente, Pasteur realizó experiencias con la bacteria de la peste aviar: realizaba inoculaciones en aves susceptibles, para estudiar el efecto de la enfermedad, cumpliendo los postulados de Koch. La historia cuenta que una vez contaba con cultivos viejos de estas bacterias, pero dado lo trabajoso de preparar medios de cultivo en aquella época, decidieron realizar las inoculaciones de todas maneras. La sorpresa fue que los cultivos envejecidos no enfermaron a las aves: ninguna murió de peste aviar. Como las aves de experimentación tenían su elevado costo, las guardaron para otra experiencia. Prepararon cultivos nuevos, (algo que habrá llevado más de una semana), y con las bacterias de la peste aviar en su máximo potencial volvieron a inocular a las aves. Lo que observaron generó una nueva sorpresa: las aves que habían sido inoculadas previamente con los cultivos viejos no enfermaron, pero las aves que nunca habían recibido inoculación de cultivos viejos enfermaron y manifestaron los signos de la enfermedad. Pasteur pensó que las bacterias envejecidas habían perdido la capacidad de enfermar, pero podían despertar la capacidad para que el animal se defienda ante la llegada posterior del mismo m.o. en estado virulento. La teoría de Darwin da respuesta a este fenómeno: el ambiente selecciona al más apto, dijo Darwin. Y en realidad, lo que fue pasando es que el medio de cultivo, a medida que envejecía, manifestaba cambios químicos (modificación de su pH, disminución del oxígeno disuelto, se acumulaban desechos metabólicos de los m.o. que en él se encontraban, etc.). Ante el cambio de las condiciones del cultivo, el patrón de selección fue cambiando, a tal punto que el medio ya muy enrarecido comenzó a seleccionar a m.o. adaptados a condiciones muy diferentes a las del cultivo original: esas bacterias adquirieron información para sobrevivir en un medio de cultivo casi tóxico, pero perdieron la información para generar enfermedad en los animales susceptibles. Hoy la inmunología llama a este

fenómeno “modificación de la virulencia”: los m.o perdieron virulencia en pos de adquirir capacidad para sobrevivir en condiciones altamente exigentes como lo es un medio de cultivo envejecido, posiblemente como causa de mutaciones o pérdida de información genética. La percepción de Pasteur fue acertada: las vacunas funcionan como in identikit del m.o. patógeno: muestran el exterior del m.o. patógeno, sus moléculas de identificación, y el sistema inmunológico (linfocitos) reconocen esa imagen química y producen anticuerpos y células de memoria, que recuerdan esa imagen y se mantienen en guardia, preparados para el momento en que, tal vez, llegue al cuerpo el verdadero patógeno: si hay defensas preparadas, el patógeno será neutralizado y no podrá generar la enfermedad.

Pasteur empleó este principio básico para inmunizar y proteger contra la rabia a las personas: utilizó virus rábico, al que le había disminuido su virulencia para el hombre mediante inoculaciones seriadas en conejos (lapinización): otra vez el mismo fenómeno descrito por Darwin, el ambiente selecciona al más apto. De entre todos los viriones originados de rabia canina, solo los más aptos para crecer en conejos lo hacían, y no solo eso, sino que cada vez lo hacían con mayor rapidez, de manera que los conejos seleccionaron a los viriones que adquirieron capacidades para crecer mejor en este animal, perdiendo información sobre cómo hacerlo en otros animales. El virus se fue transformando en mortal para el conejo y perdiendo capacidad patogénica para el hombre. Cuenta la historia que un niño había sido mordido por un cánido rabioso: dado que la enfermedad posee un 100 % de letalidad, el niño se consideraba condenado a muerte, porque nadie había sobrevivido a una infección con virus rábico. Pasteur probó su vacuna con este niño, salvándole la vida.

Antisépticos, desinfectantes y antimicrobianos:

Joseph Lister, (el mismo que obtuvo por primera vez un cultivo puro por diluciones seriadas en tubos), en 1867 inició la cirugía antiséptica con el uso de fenol, controlando así las infecciones post operatorias. Las infecciones secundarias a una cirugía constituían la principal causa de fracaso de las mismas, que generalmente concluían con la muerte del individuo. La revocación de la teoría de la generación espontánea no hizo más que demostrar que los microorganismos están en todos lados, en las manos, en el aire, y de allí contaminan las superficies inanimadas, así como a los seres vivos. Lister pensó que, eliminando estos microorganismos, disminuiría los fracasos quirúrgicos, y eso fue lo que pasó: el fenol es un desinfectante muy fuerte, uno de los pocos desinfectantes capaces de matar a los microorganismos más resistentes.

Unos años más tarde, a principios del siglo XX, un médico alemán llamado Paul Ehrlich (1854 – 1915) observó que un compuesto arsenical orgánico de tantos que habían preparado, cumplía con su idea de encontrar una sustancia que matara al m.o. responsable de la sífilis en el ser humano (*Treponema pallidum*), y al mismo tiempo no sea tóxica para el individuo enfermo, pudiendo combatir esta enfermedad de amplia distribución y para la cual hacía muchas décadas se buscaba una solución.

En 1929, un médico inglés llamado Alexander Fleming (1881 – 1955), que además se dedicaba a la bacteriología, descubrió por primera vez el efecto de un antimicrobiano. Fleming era un bacteriólogo que tenía una desprolija manera de trabajar en el laboratorio, así lo muestra alguna película incumpliendo todo tipo de norma de bioseguridad en el laboratorio (fumando o comiendo mientras procesaba sus muestras y estudiaba sus cultivos con m.o. aislados de pacientes enfermos). Una vez observó que un cultivo de estafilococos dejó de crecer: aunque el volviera a cultivar ese m.o., no crecía como era esperable. Llamándole la atención (ya que este m.o. es de fácil crecimiento en medios de cultivo convencionales), prestó más atención al suceso y observó que el cultivo estaba contaminado con un hongo, al que estudió y demostró que se trataba de un *Penicillium* spp. EL cultivo se contaminó por su manera desprolija de trabajar, pero su capacidad de observación permitió conocer que el *Penicillium* produce, entre tantos metabolitos, una sustancia que se llamó penicilina, y que puede inhibir el crecimiento de algunas bacterias. Desde que la penicilina fue descrita hasta que se diseñó su presentación para uso medicinal, pasaron muchos años, ya que su aplicación como fármaco no ocurrió hasta el año 1940. Por esta observación, Fleming recibió en 1945 el premio Nobel de Medicina.

Los virus, la genética y la biología molecular:

A fines del siglo XIX y comienzos de 1900 se realizaron las primeras observaciones de enfermedades virales: para los vegetales, el primer virus más estudiado fue el del mosaico del tabaco (descrito por Iwanowski en 1892), y con respecto a los animales el más estudiado desde sus comienzos fue el virus de la aftosa (descubierto por Loeffler y Frosch 1898). A fines del siglo XIX los virus no eran observables, debido a que el poder de resolución del microscopio óptico (única herramienta disponible en aquellos días para observar el mundo microscópico) no permite observar un virión. Se deducía su presencia, por el hecho de que algunos medios de cultivo esterilizados por filtración, (con filtros que retenían a todas las bacterias conocidas), mantenían la patogenicidad para el hospedador susceptible: por ejemplo, a pesar de haber sido filtrados, esos medios podían generar la fiebre aftosa o la enfermedad del mosaico del tabaco. Por esta razón, el primer nombre que recibieron estos microorganismos, fue el de filtrados.

En realidad, el descubrimiento y la observación de los virus es patrimonio del siglo XX. Con la aparición del microscopio electrónico, que permite observar partículas en el rango de los nanómetros (un millón de parte de un milímetro), fue en el siglo XX cuando pudieron observarse las partículas que estaba presente en los “filtrados”. A principio del siglo XX también comenzaron a desarrollarse las técnicas de cultivos celulares, que permitieron el crecimiento in vitro de los virus (ya que estos organismos no se pueden reproducir en medios de cultivo inertes, pues necesitan células vivas para utilizar su maquinaria metabólica activa para sintetizar sus proteínas y reproducirse. Recién en el siglo XX se pudieron cumplir los postulados de Koch para las infecciones virales (“el microorganismo debe ser aislado en pureza en el laboratorio, a partir de una muestra”), aunque en el siglo anterior Pasteur haya producido empíricamente la vacuna para controlar la rabia.

El siglo XX muestra una larga lista de descubrimientos virales: el virus de la poliomielitis y sus vacunas; los mecanismos de recombinación genética y de transformación de las bacterias a través de virus bacteriófagos; las formas de manejar estos mecanismos con

finés prácticos; la utilización de bacteriófagos para controlar microorganismos de interés médico o bien para identificar cepas integrantes de un taxón definido como género y especie, los virus como agentes causantes de enfermedades degenerativas como el cáncer. La presentación del modelo de los ácidos nucleicos como molécula que almacena la información vital de un m.o. facilitó el estudio y comprensión de los ciclos de vida de los virus, y obligó a la microbiología a replantearse cuál es el límite que divide lo “vivo” de lo “no vivo”. Primero fue la bacteria la partícula viva más pequeña, pero luego al conocerse la capacidad replicativa de los virus y su contenido de ácidos nucleicos, algunos investigadores consideran a estos como las partículas más pequeñas que poseen vida, si es que la vida es la capacidad de perpetuarse a través del tiempo. Los virus no lo pueden hacer de manera solitaria, requieren parasitar a una célula metabólicamente activa, pero el hecho de poseer ácidos nucleicos que otorguen la información necesaria e imprescindible para multiplicarse es motivo para que algunos investigadores incluyan a los virus entre los microorganismos.

Desde hace pocas décadas, precisamente desde la década de 1980, el límite vuelve a estar en conflicto con el estudio de los priones, proteínas pequeñas carentes de ácidos nucleicos, pero con la capacidad de transmitirse directamente de un animal susceptible a otro, y replicarse hasta enfermarlo y matarlo irremediamente (síndrome de la vaca loca; enfermedad de Crutzfeldt-Jakob en el hombre). La partícula infectante es una proteína, que puede multiplicarse en un hospedador susceptible a pesar de carecer de ácidos nucleicos (los ácidos nucleicos que contienen la información para su síntesis, se encuentran en el genoma de los hospedadores susceptibles).

Las enormes ventajas para la investigación que brinda la disponibilidad de poblaciones homogéneas con un corto período generacional (como ocurre con muchas bacterias), permitieron los avances logrados hasta hoy en lo referente a biología y fisiología celular, genética y bioquímica. La biotecnología permite hoy modificar el genoma de un organismo vivo, y conocer las funciones de los genes al observar seres vivos a los cuales se les ha anulado parte de la información genética. Esto se aprendió a hacer en bacterias, ya que la evaluación de un ensayo no llevaba más de un par de días y no hay restricciones éticas para modificar los genes de m.o. Posteriormente, este aprendizaje se aplicó a animales superiores, y hoy se pueden producir animales con genes anulados (deleteados), que permiten estudiar mecanismos de patogenicidad de partículas infecciosas controvertidas como el caso de los priones, generar modelos animales para la comprobación de vacunas, incluso el desarrollo de vacunas génicas: inoculación de porciones de ácido nucleico con el objeto de re establecer el normal funcionamiento de una célula con su genoma alterado.

Durante los últimos 30 años se ha dirigido la atención al estudio de la estructura y función de los ácidos nucleicos y las proteínas. La demostración del papel central del ADN como depósito de la información genética, el uso de sondas génicas o la reacción en cadena de la polimerasa para poner de manifiesto la presencia de un m.o. determinado en una muestra (aunque este m.o. haya muerto y no pueda crecer en cultivos), son dos ejemplos del fruto de tales avances de vital aplicación en microbiología médica. En microbiología agrícola y ambiental, se continúa con el paradigma de que el resultado observado en un ecosistema es el fruto de la interacción de múltiples m.o. diferentes. En estos casos, el aislamiento en pureza no constituye la herramienta óptima de estudio, antes de ello deben estudiarse las

actividades de diversos microorganismos de manera simultánea, (que cooperan entre sí, compiten, se sinergizan, etc.) y ello se realiza observando las actividades de síntesis de proteínas, gracias a la disponibilidad de nuevas herramientas biotecnológicas.

Bases de la epidemiología

La epidemiología es una ciencia que estudia la dinámica de las enfermedades y la distribución de cada enfermedad en el tiempo y en el espacio. Tiene un vocabulario técnico propio, herramientas que le son propias, como los mapas epidemiológicos (mapas donde se vierten datos de individuos susceptibles vs individuos afectados, fuentes de infección, posibles medios de transmisión de microorganismos patógenos, etc.), las tasas (cálculo matemático para estimar numéricamente y poder comparar objetivamente la ocurrencia de casos entre diferentes lugares o en un lugar pero en diferentes momentos históricos: tasa de mortalidad, tasa de letalidad, incidencia o tasa de ataque, prevalencia, etc.)

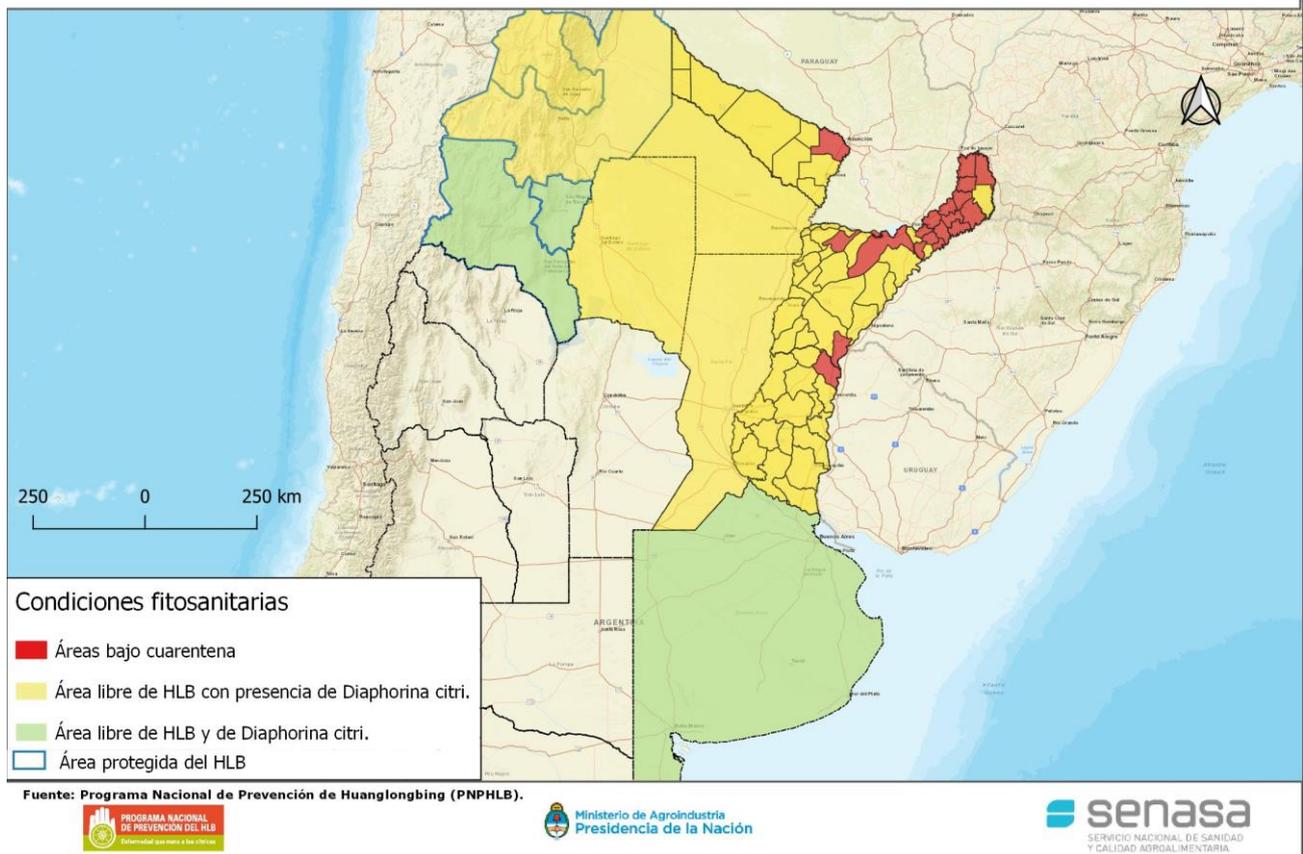
Los mapas epidemiológicos

Por otro lado, los mapas epidemiológicos constituyen la herramienta con la que nació la epidemiología. Se basa en un mapa en el que se indica la distribución de la población susceptible en estudio (si estudiamos la pandemia COVID_19 en humanos, el mapa debe contener información sobre la población total de humanos susceptible, y la de animales susceptibles que pueden funcionar como fuente de información). En el mapa deberían figurar las posibles fuentes de infección, así como las vías de transmisión. Originalmente los mapas epidemiológicos nacieron para entender la distribución y propagación de enfermedades del ser humano, particularmente la distribución del cólera en Gran Bretaña. Gracias a estos mapas, John Snow (1813-1858) pudo identificar que la fuente de cólera se hallaba constituida por un pozo de agua en particular en una localidad de Gran Bretaña: aquellas personas que consumían agua de un pozo en particular enfermaban de cólera, pero quienes consumían agua de otros pozos no se enfermaban. Luego se investigó de donde provenía el agua con que se llenaba ese pozo de agua, y pudo verificarse que era obtenida de una zona del río muy cercana al vuelco de contenido cloacal de la localidad: los enfermos de cólera eliminaban la bacteria responsable (*Vibrio cholerae*) con la diarrea, que viajaba por la cloaca hasta el río, de donde era nuevamente recolectada para llenar de agua un pozo de donde la gente se servía agua de bebida.

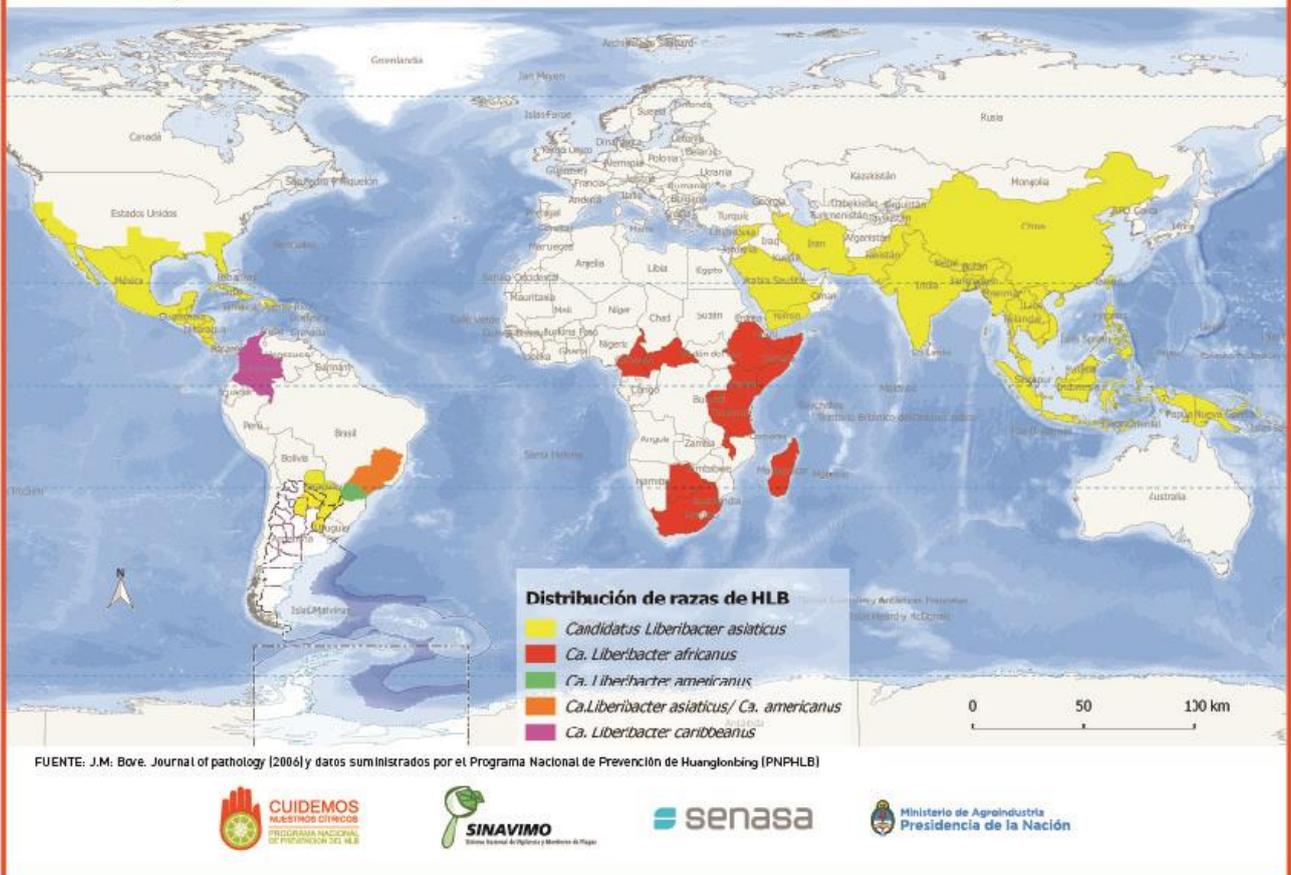
aporta aún mas valor a la ingeniosidad de John Snow en el uso de este tipo de mapas.

Actualmente los mapas epidemiológicos no solo sirven para entender como se distribuye una enfermedad, sino para tomar medidas adecuadas que faciliten controlarla. Por ejemplo, hay una enfermedad que afecta a los cítricos, conocida como HLB (Huanglongbing, producida por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, aunque hay otras formas de *Liberibacter* que también provocan la enfermedad); esta enfermedad es la mas devastadora de este tipo de frutales, y tiene una distribución mundial. Se transmite por uso de material de propagación infectado (yemas o partes vegetales infectadas), pero además la puede transmitir un vector, el insecto *Diaphorina citri*. La infección no tiene tratamiento posible, es decir, una vez que la planta se infecta muere indefectiblemente. Si la tasa de letalidad = número de muertes/número de infectados, para este caso podemos decir que la letalidad es del 100%. Para controlar esta enfermedad, lo primero que hay que hacer es conocer en cuales lugares está presente, para determinar puntos de cuarentena; por otro lado es importante conocer en que lugares esta enfermedad está ausente, para proteger esos lugares de la llegada del patógeno mediante restricciones al traslado de material de propagación posiblemente infectado y control del vector transmisor. Abajo se ve un ejemplo de mapa epidemiológico aplicado al problema del HLB en Argentina y en el mundo.

Áreas definidas para el PNPHLB



NOTIFICACIONES DE PRESENCIA DE HLB en las producciones cítricas a nivel mundial



En este mapa (fuente SENASA en: <https://www.argentina.gob.ar/senasa/micrositios/hlb>) se observa que en Argentina solo se ha identificado a *Candidatus Liberibacter asiaticus*, otras especies como *africanus* o *americanus* son exóticas por ahora en nuestro país. Esta información sirve para tomar medidas preventivas adecuadas cada vez que ingresa a la Argentina material posiblemente contaminado de los países que tienen esos patógenos y que por el momento en nuestro país están ausentes. Lo mismo vale a la inversa: en Chile no se han detectado casos, por lo tanto ese país posiblemente tenga totalmente restringido el ingreso de material biológico proveniente de Argentina.

Las tasas, herramienta fundamental en epidemiología para “medir” las enfermedades

En la tabla que sigue se mencionan algunos ejemplos de tasas muy usadas para comprender la epidemiología de las enfermedades contagiosas

TASA	Fórmula	Que información nos brinda
Mortalidad	N° de muertos/n° de susceptibles	La proporción de susceptibles que han muerto, da una idea de la susceptibilidad de la población a enfermar y luego morir por esa enfermedad
Letalidad	N° de muertos/n° de enfermos	La proporción de enfermos que mueren, nos da una idea de la posibilidad de cura una vez que el patógeno ha enfermado al susceptible. Hay microorganismos que son muy letales, como el virus de la rabia, o el virus de Ebola, esto nos indica que deben extremarse las medidas de bioseguridad ante la posibilidad de contacto con este patógeno
Prevalencia	N° de casos/n° de individuos de la zona de estudio	Nos da una idea de la probabilidad de un individuo a contraer una infección determinada; se enfoca en la frecuencia en que un patógeno es capaz de afectar a individuos de una población específica. Por ejemplo, la prevalencia de hallazgo de bacterias multirresistentes a los antimicrobianos en la población humana, un número que lamentablemente se incrementa año tras año, indicando que a medida que pasa el tiempo, la probabilidad de infectarnos con bacterias multirresistentes es cada vez mayor.

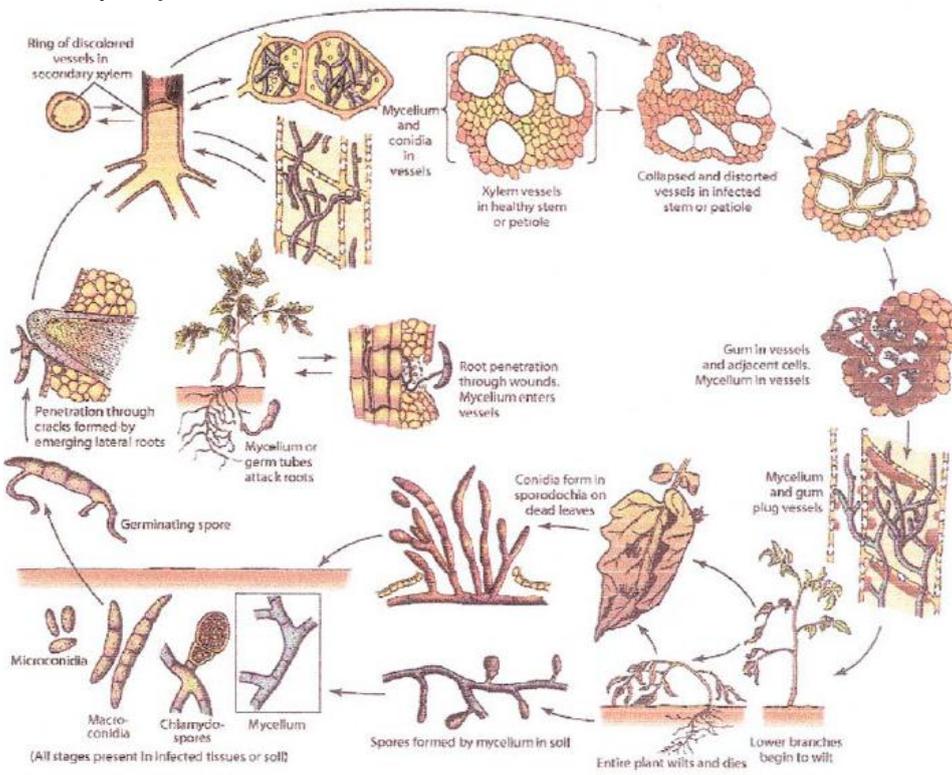
La cadena epidemiológica para comprender los mecanismos de transmisión de un patógeno

Otro recurso de la epidemiología para comprender y manejar diferentes enfermedades, es el establecimiento de la cadena epidemiológica. Luego de los experimentos de Pasteur sobre la transmisión de la enfermedad del gusano de seda, y el establecimiento de los postulados de Koch, quedó claro (a fines de los años 1800 principios de 1900) que los patógenos se pueden transmitir de forma directa, de forma indirecta (por el agua, el aire) o por vectores. Graficar las formas posibles de transmisión de un patógeno, la forma en que se produce la infección de un individuo susceptible, es de suma utilidad para establecer medidas de control de la transmisión. Por ejemplo, cuando se supo que el SARS Cov 2 se transmitía por el aire en ambientes cerrados, se recomendó por un lado la ventilación de ambientes cerrados donde concurre mas de una persona, y por otro lado el uso de mascarillas o barbijos, hasta tanto exista una vacuna que permita generar inmunidad en la

población susceptible.

Las cadenas epidemiológicas se aplican a enfermedades de los humanos, de los animales, y de las plantas. En los valles Medio e Inferior del río Negro, la producción de tomate es tradicionalmente importante. Conocer la transmisión de los principales patógenos del tomate, facilita el éxito en mejores cosechas, así como en la obtención de tomates libres de patógenos y toxinas. Un ejemplo de patógeno del tomate es un hongo, el *Fusarium*, que no solo afecta a las plantas enfermándolas y disminuyendo la producción de tomate por hectárea, sino que es capaz de producir toxinas que quedan en el tomate y no se destruyen con los procesos térmicos industriales, y esas toxinas afectan a todos los animales incluyendo al ser humano. Es decir, la elaboración industrial de puré de tomate, aunque aplica calor, no destruye las micotoxinas (producidas por *Fusarium* y por otros hongos mas). Por esta razón es fundamental conocer como se transmite esta micosis en plantas de tomate, para tomar las medidas preventivas y de mitigación mas adecuadas, en vista a tener índices productivos rentables y obtener un alimento inocuo para la población.

Abajo se observa el esquema de la cadena epidemiológica de *Fusarium* en tomate, donde se nota que el ambiente lleno de esporas infectantes de este hongo constituye uno de los principales retos para el manejo de esta problemática (Fuente: Agrios G N, Plant Pathology 5° ed, Academic Press, 2005). Dado que el suelo lleno de esporas infectantes constituye un factor de riesgo para la infección de tomate con *Fusarium*, como se ve en el esquema de abajo, la rotación de cultivo sería una herramienta sustentable para el control de este problema: donde se sembró tomate, al año siguiente realizar alguna producción que no sea afectada por *Fusarium*, de manera que las esporas ambientales infectantes vayan muriendo con el tiempo, y poder volver a sembrar tomate cuando los niveles de esporas de *Fusarium* en suelo sean muy bajos..



Disease cycle of *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

El laboratorio microbiológico

Bases para un laboratorio de microbiología de nivel I de bioseguridad

Es el edificio donde se realizará el trabajo microbiológico (procesamiento de muestras, identificación de microorganismos, puesta en práctica de los postulados de Koch, etc.). Para hacerlo de manera segura para el operario, y garantizando resultados repetibles y conclusiones confiables, debe tener características determinadas de acuerdo al tipo de tareas que en él se realizan. Puede estar destinado a enseñanza, al diagnóstico, a la investigación, así como a la producción. El modelo ideal de laboratorio debe incluir por lo menos dos secciones obligatorias y una opcional:

Un área destinada al trabajo técnico, donde se trabaje con los microorganismos. Esta zona consta de los módulos o cabinas de trabajo, que lleva anexado (con las correspondientes separaciones para evitar contaminaciones cruzadas) las salas de lavado, preparación y esterilización de materiales y medios de cultivo.

Un área destinada a trabajo no técnico, donde se encuentran oficinas (para trabajar en la realización de informes) y escritorios, baños, secretaría, computadoras con bases de datos, y si se planifica el trabajo de jornada completa debería existir una zona para refrigerio.

El parte opcional es aquella destinada a los animales de experimentación, denominada bioterio. Las exigencias para mantener y tratar a los animales de laboratorio han ido creciendo con los años, simultáneamente con el costo para poder hacerlo conforme normativas actualizadas, por esta razón cada vez son menos los laboratorios que cuentan con bioterio. En el bioterio se debe controlar extremadamente la ausencia de enfermedades, y garantizar el bienestar animal, para que los ensayos con animales ofrezcan resultados de calidad y repetibles: se ha demostrado que si los animales sufren estrés, por escuchar ruidos extraños, experimentar horarios de visita para alimentación irregulares, etc. , los resultados de los ensayos pueden tener variaciones debidas más al estrés de los animales que a las variables de estudio (una vacuna, un nuevo antibiótico, una sustancia vegetal que se está investigando contra el cáncer, efecto de extracto de cannabis, etc.).

Normas de construcción:

Hay un antiguo concepto según el cual el laboratorio debe estar aislado y lejos de los centros urbanos. Actualmente para muchos casos ese concepto es impracticable e inadmisibile, por ejemplo, para los laboratorios de diagnóstico que deben emitir rápidamente un resultado de análisis de un paciente en grave estado de salud, o el procesamiento de muestras ambientales (como ocurre con los análisis microbiológicos de agua ambiental) que deben procesarse dentro de las pocas horas de obtenida la muestra para que los resultados sean representativos. No obstante, si se tratara de un laboratorio nivel IV de bioseguridad, puede

ser conveniente que se encuentre alejado de centros urbanos, para preservar a la población ante la ocurrencia de algún accidente que permita el escape de microorganismos de elevado riesgo.

La distribución de las diferentes salas se lleva a cabo siguiendo un criterio lógico de acuerdo al tipo de tareas a las que estará destinado el laboratorio. Dicha distribución debe ser planificada con anticipación a su construcción, debiéndose evitar por todos los medios la práctica de utilizar áreas improvisadas para la instalación de un laboratorio de microbiología. En cada caso es importante verificar el camino a recorrer por el personal y por los materiales para evitar accidentes. Se debe seguir el concepto de circulación de ida o de una sola mano: las muestras ingresan al laboratorio y deben seguir un recorrido sin retroceso, de la misma manera los insumos y el personal. Para garantizar el aislamiento, se deben aplicar medidas de bioseguridad que serán mencionadas más adelante.

Los módulos o cabinas de trabajo tendrán un tamaño reducido, inferiores a 3 metros por 3 metros, para evitar las corrientes de aire. Se debe garantizar una correcta distribución de la luz artificial de manera de evitar que el cuerpo haga sombra sobre el objeto a observar (un cultivo microbiano, una placa de Petri, etc.). La mesada de trabajo debe ser impermeable, resistente a sustancias ácidas o alcalinas fuertes, así como solventes y calor moderado, y estar dispuesta a una altura apropiada y debe tener un vuelo de manera que resulte ergonómica (al estar sentado frente a ella, las piernas del operario deben poder ubicarse cómodamente). Las tomas de luz, agua y gas, deben estar en las paredes, a una altura por encima de la mesada de trabajo, en un área determinada, preferentemente dejando un área de pared libre de conexiones, para poder desinfectar eficientemente ante necesidades puntuales. Paredes, techos y piso deberán ser de superficie lisa, antiadherente y anti-absorbente (impermeable) fáciles de lavar y resistente a los desinfectantes utilizados o a las radiaciones UV que eventualmente se utilizan para la esterilización del ambiente. Las cerámicas y azulejos complican la higiene, no por su propia composición (que es ideal), sino por las juntas que se generan entre pieza y pieza de cerámica o azulejo: esas juntas son porosas y dificultan garantizar una higiene y desinfección adecuada. Los ángulos entre pared y piso, así como pared y mesada, deben estar redondeados (zócalo sanitario) de manera de evitar la acumulación de microorganismos. Cerca de los módulos de trabajo y de los sanitarios debe existir un área, aislada, destinada para guardar los elementos personales.

Equipamiento:

Para la preparación de medios de cultivo, inactivación de cultivos ya usados:

Autoclave: aporta un sistema de esterilización por calor húmedo, que protege a los medios de cultivo durante su preparación antes de ser utilizados, resguardando sus propiedades nutritivas necesarias para los m.o.

Estufa de esterilización y secado: aporta un sistema de esterilización por calor seco. Este sistema demanda más tiempo de exposición y temperatura de uso, de manera que el

material sensible no podrá ser esterilizado en estas estufas (el plástico se derrite, el algodón y el papel se incineran). Solo es apropiado para material metálico (instrumental para necropsias, equipos de embudo y porta filtro para procesamiento de agua por filtración de membrana, etc.) y material de vidrio no volumétrico: el calor seco puede producir variaciones en el volumen interno de una pipeta o un matraz graduados. Las temperaturas de uso más frecuentes son 100 °C para secado y 180°C para esterilización.

Para el procesamiento de muestras

Estufa de cultivo: el rango de temperaturas de estas incubadoras dependerá del tipo de microorganismos con el que uno desee trabajar, usualmente las temperaturas de trabajo más demandadas son 20°C, 30°C, 37°C y 42 °C.

Centrífuga: Se utilizan para separar elementos en función de su tamaño y peso molecular: células de la sangre, para concentrar bacterias en vista a realizar lavados de cultivos, etc. Deben tener un sistema de seguridad que impida la apertura de la tapa mientras la centrífuga está en movimiento. El uso inseguro de la centrífuga o la violación de los principios básicos de bioseguridad al usar este equipo, constituyen la principal causa de accidentes en los laboratorios de microbiología.

Baño de agua (baño María): se utilizan para realizar incubaciones de corto plazo (una o dos horas), asegurando la homogeneidad en la distribución del calor alrededor de un tubo que contenga una muestra: en la estufa, el calor se transmite por radiación a partir de una fuente de calor (resistencia) existiendo un gradiente de calor, por lo tanto, la homogeneidad no siempre se observa. En cambio, el baño maría o baño de agua, con agitador, permite que al instante que el tubo sea colocado en el equipo, se someta a la temperatura deseada, de manera uniforme y constante.

Sistemas de magnificación de imagen: Microscopios, lupa binocular, etc. Existen distintos tipos de microscopios, según el uso deseado. Todos poseen un sistema óptico basado en cristales, que debe ser preservado del ataque de hongos, por lo tanto, no solamente deben ser cuidados en lo que respecta a su limpieza, sino que además deben estar ubicados en una zona del laboratorio donde la humedad ambiente y el polvo se puedan minimizar.

Sistemas de refrigeración para conservación: Heladera, cámara frigorífica, freezer: Deben estar en una zona alejados de fuentes de calor, para mejorar su funcionamiento. Es conveniente que se cuente con una heladera para almacenar y mantener muestras (contaminadas) diferente de otra heladera para mantener reactivos de laboratorio, de manera de evitar las contaminaciones cruzadas.

Campana o cámara de siembra: para un laboratorio tipo I de bioseguridad, consiste en una campana con suficiente superficie de vidrio para ver a través de la misma: la muestra se abre debajo de la campana, evitando que las corrientes de aire generen contaminación de los cultivos. Requiere el uso complementario del mechero bunsen para flamear bocas de frascos, Erlenmeyer y tubos.

Cámara y jarra de anaerobios: es de uso solo en laboratorios que trabajarán con microorganismos que solo crecen bajo condiciones de ambiente gaseoso específicas, que consisten en modificaciones de las condiciones atmosféricas en las que vivimos. Consisten en elementos de cierre hermético, donde (una vez colocado el cultivo) se puede quitar la totalidad o parte del oxígeno, y completar con los gases que el microorganismo necesita en particular (dióxido de carbono, nitrógeno, etc.).

Cabina de bioseguridad: consiste básicamente en una cabina de siembra que protege las manos del operador y evita las contaminaciones de los cultivos, mediante la circulación de aire esterilizado mediante filtración. En las cabinas de bioseguridad, el filtro se encuentra en el techo de la cabina, desde donde discurre el aire en láminas horizontales paralelas al borde del frente del equipo. Ese aire estéril en láminas evita que partículas infectantes puedan escaparse al abrir un cultivo o procesar una muestra, protegiendo al operario.

Materiales de laboratorio:

Vidrio: Todo el material de vidrio empleado en el laboratorio debe ser de buena calidad (resistir cambios bruscos de temperatura), incoloro, transparente y de reacción neutra (no intercambiar iones con su contenido). El material ideal es el borosilicato neutro (Pírex). Este material es reciclable, soporta el calor húmedo del autoclave para su esterilización, y si es tratado como corresponde no presentará rallas en su interior, garantizando el correcto lavado entre uso y uso.

Tubos de vidrio: De vidrio se construyen tubos para cultivo de muestras (de diferentes capacidades volumétricas según las necesidades), incluso las campanas de Durham (una especie de tubo miniatura, que se coloca de forma invertida dentro de otro tubo de cultivo, y sirve para atrapar gases como manera de identificar microorganismos productores de los mismos: en un cultivo convencional los m.o. producen pequeñas cantidades de gases, que se eliminan hacia la zona superior del cultivo, y el operador puede no darse cuenta de su presencia, en cambio si se coloca una campana Durham, cada micro burbuja de gas es atrapada en dicha campana, posteriormente se unirán y formarán una burbuja de aire lo suficientemente grande como para ser identificada a simple vista.

Tapones: Existe la posibilidad de utilizar tapones de algodón, como lo hacían los viejos microbiólogos Pasteur y Koch, no obstante, estos tapones no son reciclables, y a veces dejan restos en los cultivos, o se pegan a la superficie interior de los cultivos. Por esta razón, para los tubos existen los tapones tipo capuchón, o tapón bacteriológico, que, si bien el cierre debe ser ajustado, permiten el ingreso de pequeña cantidad de aire para que los microorganismos aerobios puedan crecer sin inconveniente (estos tapones permiten el ingreso de oxígeno de la atmósfera, y la eliminación de gases producidos por los microorganismos). Para los microorganismos anaerobios, se usan otro tipo de tapones, como los tapones a rosca, de cierre hermético, que impiden el ingreso de oxígeno. Para microorganismos cuyo cultivo demora mucho tiempo y es imprescindible evitar la evaporación del agua del medio de cultivo, (para mantener la osmolaridad a lo largo de todo el tiempo de cultivo) también se usan tapones a rosca, por ejemplo, para los casos de

cultivos de hongos en tubo, mycobacterias y leprospiras, que pueden demandar más de 2 meses de cultivo. Los tapones de corcho, que pueden emplearse en ensayos químicos, están contraindicados en microbiología: su porosidad puede albergar microorganismos que no hagan otra cosa que contaminar los cultivos.

Pipetas de vidrio: pueden ser graduadas o no. Las primeras pueden tener uno o dos aforos, entendiéndose por aforo a cada límite de su escala de graduación. Las más empleadas en el laboratorio son de 0,1mL; 0,2mL; 1mL; 5mL y 10 ml. Las pipetas graduadas se utilizan por ejemplo para diluciones seriadas, en las que es necesario tomar un volumen exacto de un cultivo líquido. En cambio, las no graduadas se utilizan para trasvasar medios o reactivos líquidos. Entre las no graduadas encontramos a las pipetas Pasteur caracterizadas por una punta muy aguda y filosa, captan contenido líquido por capilaridad debido a su extrema delgadez, y tradicionalmente se utilizan para obtener submuestras a partir de materiales biológicos (sangre intracardiaca o contenido del interior del riñón en animales de estudio).

Las placas de Petri, se componen de una base donde se vierten los medios de cultivo, y una tapa que los cubre. Pueden ser de vidrio (reciclables) o de plástico (descartables). Una vez preparadas, la base se coloca en la parte superior, y la tapa funciona como base, de esta manera se disminuye la evaporación de agua de la lámina de agar, y el cultivo puede ser mantenido por más tiempo sin verse afectado su osmolaridad original.

Probetas: Con un cilindro de vidrio o de plástico, diseñados para medir volúmenes de líquido mayores a los que permite medir una pipeta. Las más utilizadas son de las de 25mL, 50mL, 100mL, 500mL y 1000 ml. En algunos casos se usan como parte de procesamiento de muestras, en cuyo caso deben ser previamente esterilizadas, por lo cual se adoptan las de vidrio. Las de plástico sirven solamente para la medición de volúmenes de agua y o reactivos antes de ser esterilizados (se esterilizarán luego de haberse fraccionado en frascos o tubos de vidrio con tapones eficientes).

Mango de Kolle: Es una varilla metálica con un mango impermeable y aislante térmico (la necesidad de que sea impermeable para una correcta desinfección, erradica la posibilidad de adoptar mangos de madera). En un extremo se coloca un alambre de platino o nicrom que constituye lo que denominamos ansa, y que se moldea con un calibrador o arrollando el extremo libre del alambre sobre una pipeta Pasteur o con una pinza de punta larga, centrándolo luego. Es la herramienta con la que tomaremos muestras biológicas contaminadas, cultivos puros, para pasarlos de un medio de cultivo a otro. Su carácter metálico permite esterilizarlo pasándolo por el mechero de Bunsen. La composición química del alambre es fundamental, los de platino o nicrom se caracterizan por baja inercia térmica: se calientan rápido, y se enfrían rápido una vez que han sido retirados del mechero Bunsen.

Mechero Bunsen: Se emplea para el trabajo de microbiología, realizando todas las maniobras a su alrededor, técnica conocida como “trabajar al abrigo de la llama”. Mientras no se esté trabajando, puede mantenerse con la llama encendida en el modo piloto. El ideal funciona a gas, ofreciendo una llama de un largo considerable, que en su extremo puede alcanzar los 1.500 °C. Para las situaciones en las que no se dispone de gas, se pueden realizar mecheros que combustionen alcohol (de vidrio o de metal). En los laboratorios tipo I de microbiología, el mechero es la herramienta fundamental para ejercer acciones de

contención primaria (proteger al operario) y contención secundaria (proteger al ambiente) cuando se trabaja con microorganismos, a su vez es la manera de evitar que se contaminen cultivos microbianos con bacterias transmitidas por el aire.

Antiséptico: Si se utilizará para desinfectar material de vidrio, es indiferente el tipo de antiséptico a utilizar, pudiendo adoptar el uso de hipoclorito de sodio (lavandina), pero si se utilizará material metálico es preferible usar cloroxilenol diluido, ya que la lavandina oxida y deteriora el material metálico. Se debe tener a mano un recipiente con antiséptico, de manera que, ante cualquier accidente de derrame de cultivos contaminados, se pueda neutralizar el accidente y aplicar una correcta práctica de contención. Es una buena práctica de laboratorio, limpiar la mesada con antiséptico antes y después de cualquier maniobra microbiológica.

Principios de bioseguridad

El significado de la palabra bioseguridad ha ido cambiando levemente, a medida que esta área de conocimiento ha ido creciendo y fue incorporándose en ámbitos diferentes. Originalmente se entendía por bioseguridad al conjunto de medidas y criterios tendientes a disminuir el riesgo biológico de quienes trabajan con microorganismos. Si pensamos que riesgo es la probabilidad de que ocurra lo indeseable, disminuir el riesgo significa minimizar la probabilidad de accidentes laborales en el trabajo con seres vivos.

Posteriormente, alguna gente ha ido combinando la bioseguridad con la seguridad laboral, y se incorporaron otros riesgos como los físicos y los químicos. Actualmente se entiende por bioseguridad al conjunto de medidas destinadas a la protección de la salud y seguridad personal mediante el mantenimiento de la vigilancia y el control de instancias de riesgo laboral procedentes de agentes biológicos, físicos o químicos. Pero en esencia, la bioseguridad debería incluir solo riesgos biológicos para el operario y para el ambiente. Esas medidas, si bien en gran parte son de tipo preventivas, también incluyen acciones para reducir los posibles daños una vez que el accidente ha ocurrido. Actualmente se aplican extensiones de criterios de bioseguridad al trabajo de campo, fuera del laboratorio: no solo en instancias de muestreo, (trabajo de campo para toma de muestras de potencial riesgo biológico), sino para minimizar los riesgos de ingreso de patógenos en unidades de producción: hoy es inconcebible una granja de producción intensiva avícola, porcina, un centro de transferencia embrionaria e inseminación artificial bovina, sin prácticas de bioseguridad para evitar que los animales hacinados sean alcanzados por algún microorganismo patógeno: el concepto de bioseguridad viajó del laboratorio al campo.

El trabajo con microorganismos de variada patogenicidad (que son los agentes biológicos causantes de enfermedades infectocontagiosas) incluye riesgos inherentes a los mismos: manipular una muestra que contiene un microorganismo patógeno expone al operario al riesgo de infectarse con dicho agente patógeno, pero el riesgo aumenta conforme aumenta el número de microorganismos en un cultivo ya que la concentración de microorganismos en un cultivo supera ampliamente la que podemos encontrar en una muestra o en condiciones naturales a campo.

Además de los riesgos biológicos, en los laboratorios se cuenta con equipos, insumos, reactivos químicos, instalaciones eléctricas, que aportan un riesgo físico y/o químico al riesgo netamente inherente a los microorganismos: por ejemplo, el uso de autoclaves nos expone a riesgos físicos debido a la posibilidad de explosión en caso de mal uso o mal funcionamiento del mismo, o a quemaduras por vapor si no respetamos los pasos y tiempos de uso. Pero también existen riesgos biológicos por mal uso de las instalaciones o aparatos del laboratorio o por el uso de los mismos cuando se hallan en mal estado: ¿Qué pasaría si luego de cultivar un microorganismo patógeno presente en una muestra biológica con fines diagnósticos, colocamos todos los elementos contaminados en un autoclave que funciona mal, realizamos un ciclo de esterilización que creemos correcto (120 °C durante 20 minutos) pero en realidad el autoclave no alcanza dicha temperatura porque el indicador de presión funciona mal? ¿Qué pasa si luego de someter los elementos contaminados a ese ciclo de autoclave en mal funcionamiento, los retiramos y los lavamos si fueran de vidrio, o los descartamos si fueran descartables? Probablemente, al descartar elementos contaminados y sometidos a procesos de esterilización deficientes, contaminemos el medio ambiente y exponamos a los hospedadores sanos y susceptibles a un riesgo de infección, incluso a las personas si son susceptibles a dicho patógeno. En el caso del material reciclable (tubos de vidrio, pipetas, placas de Petri de vidrio) al reintroducirlos en el laboratorio luego de un proceso de esterilización deficiente, estaríamos exponiendo al personal del laboratorio a infectarse, y a la vez generando contaminación de las nuevas muestras al procesarlas con materiales contaminados mal esterilizados. Podríamos decir cosas similares con respecto a las estufas de incubación, las heladeras, los termos de nitrógeno líquido necesarios para mantener microorganismos viables inalterados a través del tiempo, flujos laminares, etc. Este análisis también se aplica a la extensión del concepto de bioseguridad al trabajo a campo o en granjas.

Para minimizar los riesgos, los laboratorios de microbiología requieren que se establezca y cumpla un Programa de Bioseguridad como parte fundamental de su organización y funcionamiento. El objetivo de estos programas es lograr un ambiente de trabajo ordenado y seguro, que conduzca a mejorar la calidad y alcanzar niveles óptimos de trabajo confiable. Un programa de bioseguridad implica el análisis previo de los riesgos propios de cada laboratorio, y en función de los mismos la elaboración de un manual de bioseguridad que establezca las medidas y criterios que minimicen los riesgos identificados. Lo mismo vale para el trabajo de bioseguridad a campo.

La bioseguridad en laboratorios de microbiología

Los laboratorios de microbiología se clasifican en niveles de bioseguridad, según las capacidades para minimizar los riesgos biológicos. Existe un criterio para clasificar a los laboratorios, y para comprenderlo resultan necesarios conocimientos previos: clasificación de los microorganismos según el riesgo que implica trabajar con ellos, ciertas características epidemiológicas de los microorganismos, el riesgo respecto del tipo de práctica de laboratorio a realizar, así como el significado de algunos términos propios de este área de conocimiento (glosario) así como. A continuación, veremos una síntesis de estos tres aspectos.

La bioseguridad fuera de los laboratorios de microbiología

Hay que destacar que la bioseguridad es un concepto que nació para aplicarse en el trabajo con microorganismos en laboratorios, pero poco a poco ha sido incorporado en contextos muy diversos. En los trabajos ambientales, donde pueden estar presentes microorganismos con poder patogénico, se aplica bioseguridad en el estudio de enfermedades de animales y plantas así como en estudios sobre aguas y suelos. En parte, para protección del personal que se encuentra realizando la investigación, en vista a evitar su infección. Pero también para evitar la diseminación de microorganismos que, aunque no sean patógenos para el personal que se encuentra realizando el muestreo, pueden ser patógenos para plantas o perjudicar la biodiversidad. En contextos de producción agropecuaria, los establecimientos deben implementar prácticas básicas de bioseguridad, con el objetivo de evitar que ingresen microorganismos patógenos que puedan generar enfermedades y pérdidas económicas en el objeto de la producción, ya sea animal (ganado, piscicultura, apicultura) o vegetal (horticultura, fruticultura, producción de gramíneas o leguminosas para consumo humano o forraje) etc.

Clasificación de los microorganismos en grupos de riesgo

Los microorganismos se clasifican en cuatro grupos, considerando dos criterios simultáneamente: por un lado, el riesgo para la salud de la persona que manipula una muestra con dicho microorganismo, y por el otro lado el riesgo que implica para el ambiente en caso que dicho microorganismo salga del laboratorio.

Para conocer el riesgo que implica para el operario, interesa saber algunas características del microorganismo: su patogenicidad (capacidad de generar enfermedad), forma de transmisión (se transmite por contacto directo por la piel, por vía oral, o por vía aerógena?), supervivencia del microorganismo en el ambiente (el microorganismo muere al contacto con el aire o puede sobrevivir varias semanas en el ambiente a pesar de carecer de humedad?), posibilidad de tratamiento antimicrobiano en caso de infección por accidente, disponibilidad de vacunas eficientes para prevenir una infección accidental, etc.

Para conocer el riesgo que implica para el ambiente, interesa saber si el microorganismo tiene posibilidad de utilizar reservorios y vectores para su transmisión (y diseminarse en el ambiente rápidamente), si el microorganismo es exótico o no en el lugar de trabajo, la forma de transmisión (si se transmite por el aire puede diseminarse más rápidamente que si se transmite por contacto directo).

Considerando estos dos enfoques, los grupos en que se clasifican los microorganismos se muestran en la siguiente tabla

	Microorganismos de riesgo I	Microorganismos de riesgo II	Microorganismos de riesgo III	Microorganismos de riesgo IV
Riesgo individual	Bajo	Moderado	Alto	Alto
Riesgo ambiental	Bajo	Bajo	Moderado	Alto

Conocer los grupos de riesgo en que se clasifican los microorganismos es fundamental, para establecer las medidas de seguridad en trabajo a campo (en caso de tener que manipular muestras que pudieran contener alguno de ellos), y para categorizar a los laboratorios en niveles de bioseguridad.

Características de los microorganismos vinculadas al proceso de infección/enfermedad, que condicionan las medidas de bioseguridad requeridas en los laboratorios para poder trabajar con ellos:

Respecto a la vía de transmisión: Existen microorganismos capaces de transmitirse por el aire, sin la acción de ningún facilitador intermediario entre la fuente de infección y el hospedador. Es el caso de microorganismos resistentes a la desecación y suficientemente pequeños y livianos para mantenerse suspendidos en el aire y vehiculizarse en él, como ciertos virus, las clamidias como *C. psittaci*, incluso las esporas tanto de bacterias como de ciertos hongos. Estos microorganismos que se transmiten por el aire podrían tener elevado riesgo comunitario (en el caso de generar enfermedades de rápida difusión como la gripe), porque se transmitirían rápidamente entre los hospedadores del ambiente si se por algún error de manejo se escapan del laboratorio. Sin embargo, estos microorganismos especial interés por presentar elevado riesgo individual, ya que el operador de una muestra se encuentra en riesgo de infección solo por el hecho de respirar, algo que no puede evitarse. Para poder contener a estos microorganismos en el laboratorio se requieren exigentes medidas de trabajo, además de instalaciones adecuadas como las llamadas “cabins de bioseguridad”, que disminuyan el riesgo de inhalación protegiendo a los operarios. En el trabajo a campo con estos microorganismos, es indispensable el uso de máscaras de bioseguridad, ya que no alcanza con utilizar un simple barbijo para contener estos microorganismos. Generalmente estos microorganismos se estudian en laboratorios de nivel 2, 3 o 4. A diferencia de estos microorganismos, aquellos que no se transmiten pro el aire e ingresan naturalmente por vía oral (*Salmonella* spp, *Escherichia* spp, etc.) son más fáciles de contener: solo con buenas prácticas de laboratorio (maniobras de trabajo cuidadosas) suele darse contención suficiente, no solo para el operario sino para el ambiente.

Respecto de la patogenicidad, inmunoprofilaxis y tratamientos antimicrobianos disponibles para el caso de infección accidental: La patogenicidad determinará el grupo de riesgo al que pertenece el microorganismo: si el microorganismo posee elevado riesgo para el operario, por ser muy patógeno (riesgo de elevada virulencia), deberá trabajarse en un laboratorio tipo III o IV. No obstante, existe la posibilidad de disponer de vacunas eficientes, inocuas y seguras, que administradas al personal que manipularía la muestra, le ofrezcan protección en caso de accidentes. Entonces, si el microorganismo es muy virulento, pero hay vacunas disponibles ¿Debe trabajarse si o si en un nivel IV de máxima seguridad? La respuesta sería: “no siempre, depende de otras cosas”, porque si el operario puede inmunizarse con una vacuna segura, aunque exista riesgo de infección, dicha infección no generaría enfermedad en una persona inmunizada correctamente. Por esta razón, existiendo vacuna antirrábica eficiente, aunque el virus de la rabia se caracterice por una elevada mortalidad en personas afectadas sin vacunación previa, la posibilidad de vacunar al personal expuesto minimiza la probabilidad de enfermedad, por esa razón para este virus no es necesario trabajar bajo el máximo nivel de bioseguridad (nivel IV), pero es imprescindible que el personal expuesto se encuentre inmunizado. Inverso razonamiento aplicaríamos para microorganismos infectocontagiosos, que generan enfermedades de baja mortalidad pero para los cuales no existe tratamiento médico posible ni vacunas disponibles: es el caso de las bacterias que producen la brucelosis: aunque los infectados con este microorganismo no mueran por ello, su manipulación debe ocurrir en un laboratorio tipo III, ya que en caso de infección no existe tratamiento antimicrobiano disponible, y la persona infectada llevara su enfermedad por el resto de su vida. Esto alerta también sobre el trabajo a campo: si corremos riesgo de tomar contacto con material infectado con especies patógenas del género *Brucella* debemos ultimar todas las medidas de bioseguridad: guantes, gafas, calzado impermeable, etc. sumado a las buenas practicas, como por ejemplo no consumir alimentos mientras se está trabajando con material posiblemente contaminado con estos microorganismos.

Respecto de las características epidemiológicas del microorganismo con el cual se está trabajando, en relación a su presencia o ausencia en la región: Las medidas de contención secundaria (protección del medio ambiente) dependen del daño potencial que podría producir el microorganismo en caso que se escapara del laboratorio. Esto es particularmente para microorganismos de tipo exóticos, para los cuales (y aunque en el medio ambiente no se encuentren los mismos) a veces algunos laboratorios realizan investigaciones con el fin de elaborar herramientas para controlarlo en caso que dicho microorganismo ingresara a la región donde era libre. Esto sucede por ejemplo para la fiebre aftosa en la Argentina: nuestro país es libre de fiebre aftosa, no obstante, en algunas regiones de nuestro país se realiza vacunación de animales susceptibles, y esas vacunas hay que producirlas, para ello es necesario cultivar el virus en laboratorios, pero.... ¿Qué pasaría si el virus de la aftosa, se escapara de un laboratorio que produce vacunas de aftosa en Argentina? Nuestro país perdería el estatus internacional de “Libre de fiebre aftosa”, y eso cerraría las puertas al mercado exportador de carnes, generando un fuerte impacto económico en el país. Por esa razón, en Argentina el trabajo con virus aftosa está restringido a unos elegidos laboratorios, con niveles de bioseguridad cercanos al IV, a pesar de que este virus no posee riesgo elevado para el operador (la gente no se enferma frecuentemente de aftosa), sería capaz de ocasionar graves efectos ambientales si se escapa de un laboratorio, dado que Argentina es país libre de fiebre aftosa circulante.

Riesgo respecto del tipo de práctica a desarrollar en el laboratorio:

Hay diferentes métodos diagnósticos para un mismo microorganismo patógeno. Algunos métodos no requieren que el microorganismo se encuentre vivo, incluso puede ser parte del protocolo de remisión de muestras enviarlo en alguna especie de conservante, que además garantice la inocuidad de la muestra, como por ejemplo sucede con los métodos genéticos o moleculares de detección de microorganismos. Para el mismo microorganismo, otros laboratorios pueden optar por el aislamiento en pureza y la identificación: en estas tareas se requieren las prácticas de cultivo, durante las cuales se incrementa significativamente el número de microorganismos que arribó al laboratorio en la muestra original. A pesar de trabajar en el diagnóstico del mismo microorganismo, en el primer caso no existió “amplificación” de la población del microorganismo, en el segundo caso sí. Si consideramos que el riesgo de infección se encuentra determinado, entre otras cosas, por la concentración del microorganismo en cuestión, podemos darnos cuenta que un laboratorio como el de diagnóstico molecular representa un riesgo microbiológico menor para el operario que un laboratorio donde se realicen cultivos y amplificaciones microbiológicas. Más aún, si se trata de virus o algún parásito intracelular obligado que requiere el cultivo en animales de experimentación. Esta reflexión nos debe hacer pensar en que, aun para un mismo microorganismo, puede ser necesario requerir diferentes niveles de bioseguridad según el tipo de práctica a desarrollar en el laboratorio.

ANTES DE DECIDIR TRABAJAR CON UN MICROORGANISMO EN EL LABORATORIO (O PROCESAR UNA MUESTRA EN EL LABORATORIO QUE PODRÍA CONTENER UN DETERMINADO MICROORGANISMO) DEBEMOS REALIZAR UN ANALISIS DE RIESGO CONSIDERANDO LA PATOGENICIDAD, VIRULENCIA POSIBLE, DISPONIBILIDAD DE TRATAMIENTO MEDICO EN CASO DE INFECCION ACCIDENTAL, VACUNAS DISPONIBLES, ETC.

DE LA MISMA MANERA, ANTES DE MANIPULAR UN ANIMAL O INGRESAR A UN AREA NATURAL DONDE PUEDEN CIRCULAR MICROORGANISMOS PATÓGENOS, DEBEMOS REALIZAR UN ANALISIS DE RIESGO: ANALIZAR LOS RIESGOS PARA NUESTRA SALUD Y PARA EL AMBIENTE (EN CASO DE DISEMINAR UN MICROORGANISMO PATÓGENO INVOLUNTARIAMENTE). **SI NO DISPONEMOS DE TODAS LAS MEDIDAS DE CONTENCIÓN QUE SE EXIGEN PARA MINIMIZAR EL RIESGO BIOLÓGICO, NO DEBERÍAMOS EXPONERNOS A DICHO RIESGO.**

Glosario de bioseguridad

Aerosoles de laboratorio: Los aerosoles constituyen una suspensión de partículas invisibles al ojo (microscópicas), que por su pequeño tamaño y escaso peso se mantiene en el aire. Se pueden producir accidentalmente durante cualquier actividad desarrollada en el laboratorio. Si los aerosoles contienen microorganismos patógenos, constituyen un riesgo para el personal. Los aerosoles se pueden clasificar en dos tipos: con partículas mayores a

5 micras y con partículas menores a 5 micras. Los primeros se depositan rápidamente y contaminan las superficies de trabajo y la piel del operador. En cambio, los aerosoles con partículas menores a 5 micras se secan rápidamente, y al perder el agua se tornan más livianos, permaneciendo en suspensión por más tiempo pudiendo ser arrastrados por las corrientes de aire. Hay actividades desarrolladas en el laboratorio que entrañan mayor riesgo de producción de aerosoles, como el destapar bruscamente muestras para diagnóstico o cultivos bacterianos, flamear el anillo metálico del mango de Kolle cuando ésta se encuentra contaminada con una gran cantidad de cultivo, transvasar líquidos infectantes, agitar un envase con suspensión de microorganismos, desintegrar en un mortero tejidos para su posterior análisis, abrir ampollas de cultivo, destapar tubos luego de haberlos sometido a centrifugación o agitación, pipetear líquidos contaminados, manipular jeringas y agujas con muestras de sangre.

Accidente: Suceso eventual, inesperado, generalmente de consecuencias desagradables.

Agente microbiológico exótico: se define como “exótico” a un microorganismo que se ha demostrado su ausencia en una zona determinada. Por ejemplo, dado que la Patagonia es libre de fiebre aftosa (un virus que afecta al ganado), el virus de la fiebre aftosa es “exótico” en la Patagonia.

Agentes de riesgo: Entes capaces de generar daño generalmente como consecuencia de accidentes. Pueden ser biológicos, físicos o químicos:

Agentes biológicos de riesgo: Microorganismos que puedan atravesar las barreras corporales (membranas mucosas) por inhalación, ingestión o inoculación directa accidental. Pueden estar en muestras biológicas, transmitirse por objetos contaminados incluso por vectores (por esta razón es imprescindible que, en los laboratorios, los programas de bioseguridad incluyan planes de control de plagas, que puedan funcionar como vectores o transmisores de estos agentes de riesgo biológico).

Agentes físicos y mecánicos de riesgo: Temperaturas extremas, fuentes de alta tensión eléctrica, radiaciones, ruidos excesivos, vidrios rotos de recipientes dañados, agujas y bisturí contaminados, material de necropsias (tanto las muestras de necropsias biológicas como las herramientas contaminadas).

Agentes químicos de riesgo: sustancias químicas corrosivas (ácidos y álcalis fuertes), tóxicos, carcinógenos, inflamables y explosivos.

Contención: Métodos seguros para el manejo de elementos que contengan agentes de riesgo biológico. Acciones destinadas a disminuir los riesgos de accidentes al utilizar microorganismos. Se consideran de tipo primaria o secundaria según el alcance de dichas medidas

Contención primaria: Protección del personal y del ambiente inmediato, que está manipulando un elemento que contiene un agente de riesgo biológico. Esa protección se basa en prácticas correctas y equipos de seguridad utilizados eficientemente.

Contención secundaria: Protección del medio externo, está dada por la combinación entre el diseño de las instalaciones, prácticas correctas e instalaciones adecuadas.

Las prácticas de contención primaria y secundaria, diseñadas para aplicar en un laboratorio, se pueden extrapolar para aplicar a campo, en tareas de muestreo, o bien en la gestión de establecimientos productivos intensivos.

Endémico: Es un término que se refiere a un agente patógeno que se encuentra naturalmente en una región, está establecido, y produce un número esperado de casos de infección por año. Un microorganismo “endémico” en un sentido es lo opuesto a un microorganismo exótico.

Exótico: Es un término que se utiliza para referirse a microorganismos que no se encuentran circulando en el ambiente, en una región determinada. Por ejemplo, Tierra del Fuego es libre de brucelosis, la Patagonia es libre del virus de la fiebre aftosa. Esa situación se debe a eficientes y permanentes acciones de control sanitario.

Enfermedad Ocupacional: Patología producida por la acción de un agente de riesgo durante el ejercicio laboral. La brucelosis es una enfermedad ocupacional: estadísticamente los veterinarios y el personal rural y de frigoríficos presentan prevalencias de brucelosis muy por encima del resto de la población.

Factor humano: Acciones humanas erróneas que originan situaciones de riesgo, desencadenando episodios de accidentes.

Riesgo: Probabilidad de que ocurra un accidente. Peligro o proximidad de un daño.

Clasificación de laboratorios microbiológicos según “Niveles de Bioseguridad”

Volviendo al tema de los laboratorios y la bioseguridad, estos se clasifican en niveles de bioseguridad, en función de las posibilidades de contención de las que disponen. Es importante tener conciencia del nivel de bioseguridad que posee el laboratorio donde se trabaja, y evitar trabajar con aquellos microorganismos para los cuales en dicho laboratorio no se cuenta con apropiadas medidas de contención.

Nivel de bioseguridad 1

Estos laboratorios están destinados principalmente a la enseñanza y al diagnóstico de microorganismos de bajo riesgo para el operario. Poseen equipos de seguridad y reglamentaciones de índole general. Las normas de seguridad están destinadas sobre todo a la protección de los cultivos: evitar que los cultivos puros o las muestras recibidas se contaminen con microorganismos ambientales, o con microorganismos del operario. Esto es debido a que se trabaja con microorganismos no patógenos, o con un riesgo individual

bajo y un escaso riesgo ambiental en caso de escape del microorganismo del laboratorio. El principal elemento de contención primaria en este tipo de laboratorios es el mechero tipo Bunsen y el trabajo correcto “al abrigo de la llama”. Como elemento de contención secundaria (protección ambiental) alcanza con esterilizar los cultivos utilizados antes de reciclar los elementos de vidrio como placas de Petri y tubos, para ello se suele utilizar un autoclave. La clave en este tipo de laboratorios se encuentra en las correctas prácticas de laboratorio, un listado de cómo trabajar en un laboratorio de microbiología, que, si bien aplica a todos los niveles de bioseguridad, pero para los laboratorios tipo I constituyen la principal manera de contención primaria y secundaria (ver más adelante el ítem “correctas prácticas en un laboratorio microbiológico”).

Nivel de bioseguridad 2

Estos laboratorios poseen elementos de contención (equipos, instalaciones, diseño arquitectónico), permitiendo trabajar de manera segura con microorganismos de relativo riesgo para el operario (riesgo moderado). Generalmente se trata de microorganismos que ingresan por vía oral, y poseen cierta capacidad de supervivencia ambiental, por lo tanto, debe asegurarse que no salgan de los medios de cultivo por errores de manejo o trabajo inadecuado. Estos laboratorios no poseen capacidad para contener escapes de algún microorganismo de riesgo ambiental, por ello no es posible trabajar con microorganismos exóticos, ni con aquellos que de escaparse podrían generar un gran inconveniente en el ambiente, a pesar de ser endémicos. En estos laboratorios se debe trabajar de la misma manera cuidadosa que en el laboratorio tipo I, y además se debe contar con cabinas de bioseguridad (equipo especial que protege al operario mientras está trabajando con un microorganismo patógeno).

Nivel de bioseguridad 3

Estos laboratorios cuentan con equipos, instalaciones y edificios con arquitectura tal, que garantizan las medidas de contención para microorganismos de riesgo elevado para el operario y moderado para el ambiente. A diferencia de los de nivel I y II, a partir de este nivel de bioseguridad empieza a ser importante la contención secundaria (evitar el escape de microorganismos al ambiente). En estos laboratorios no solo se realiza diagnóstico, sino además investigación. La contención del operario es rigurosa, ya que los microorganismos manipulados en un laboratorio de nivel III podrían generar enfermedades graves, enfermedades para las cuales los tratamientos médicos pueden fallar, o enfermedades para las cuales no hay vacunas protectoras eficientes.

Nivel de bioseguridad 4

Este tipo de laboratorios cuenta con medidas de contención extremas, tales que permite trabajar con agentes extremadamente patógenos para el personal de laboratorio, y que además deben ser contenidos en el laboratorio evitando se escapen al medio ambiente por el alto riesgo ambiental que poseen (ya sea por ser microorganismos exóticos, de rápida difusión en una población sensible, etc.). En este caso el riesgo individual y comunitario es elevado. En la sala de trabajo con microorganismos de este tipo de laboratorios, el operario se encuentra totalmente aislado con un traje especial, conectado a una fuente de aire para respirar independiente al aire de la sala, de manera de evitar la infección por vía aerógena.

Este tipo de laboratorios es el destinado para trabajar con microorganismos patógenos de alta mortalidad para los cuales no hay tratamientos antimicrobianos posibles ni vacunas protectoras, de manera que los operarios podrían morir en caso de infecciones accidentales.

Correctas prácticas en un laboratorio microbiológico

La mayor garantía de bioseguridad en un laboratorio, se encuentra en el cumplimiento estricto de normas y actitudes tendientes a evitar la infección del operario, el escape de los microorganismos del laboratorio, así como la contaminación de los cultivos con microorganismos ajenos provenientes del aire, del operador, o de elementos contaminados. Ningún equipo, (aunque posea el mayor grado de sofisticación), ofrece garantía de trabajo si el operario no cumple las correctas prácticas para un laboratorio de microbiología. A continuación, se mencionan solo algunas medidas a tomar en laboratorios (básicamente en los laboratorios tipo I), para minimizar los riesgos microbiológicos, físicos y químicos.

Consideraciones sobre actitudes que se deben cumplir en un laboratorio de microbiología

- Todos los procedimientos aplicados sobre muestras y cultivos deben realizarse con el máximo cuidado tendiente a minimizar la producción de aerosoles (ver “aerosoles” en glosario). Siempre se deberá caminar y desplazarse sin realizar movimientos bruscos, evitando la formación de corrientes de aire, sobre todo mientras alguien esté abriendo cultivos para realizar alguna maniobra especial (aislamiento, antibiograma, identificación bioquímica, etc.)
- Las superficies de las mesas de trabajo deberán desinfectarse antes y después de cada una de las jornadas.
- El personal deberá higienizarse las manos con algún producto jabonoso que permita la limpieza y desinfección, luego de cada jornada de trabajo.
- Es obligatorio el uso de batas o delantales, y en los casos necesarios, guantes, barbijos o cofias.
- Circular solamente por las zonas permitidas y hacerlo lentamente a fin de evitar las corrientes de aire.
- Cualquier accidente que ocurra deberá ser comunicado de inmediato al encargado del laboratorio.
- Antes de retirarse, al concluir el trabajo, verificar que las llaves de gas, agua y luz se encuentren cerradas.
- Los alimentos, bebidas, golosinas, etc., se consumirán fuera del

laboratorio. Nunca usar los recipientes del laboratorio para beber líquidos. Los refrigeradores, congeladores y freezer destinados a mantener muestras y reactivos no deben utilizarse para colocar alimentos, evitando así la contaminación.

- Luego de haber realizado alguna maniobra microbiológica (cultivo, aislamiento, etc.) debe evitarse llevarse las manos al rostro personal, o tocar a otras personas u objetos, sin antes lavarse las manos con algún jabón desinfectante.

- El cabello largo y la barba no son recomendables en el laboratorio; en caso necesario se deberán utilizar cofias y barbijos. El cabello largo no solo puede llevar microorganismos al cultivo (generando contaminaciones) sino que puede ser contaminado con microorganismos del cultivo, acarreado los mismos al domicilio particular luego del trabajo. Para evitar esto, el cabello largo debe estar recogido, y en caso de no poder asegurarlo deberá utilizarse cofia.

- Nunca se pipeteará con la boca. Para minimizar el riesgo de ingreso de microorganismos por vía oral, se utilizarán pro pipetas.

- Ante la necesidad de manipular material contaminado de origen desconocido, se recurrirá al uso de guantes. Los mismos sirven como barrera de protección para impedir la contaminación de las manos. Sin embargo, los mismos no siempre son impermeables, y siempre existe el riesgo de roturas, por eso aún después de utilizar guantes, se deberá realizar un lavado antiséptico de manos (ver más adelante).

Consideraciones sobre instalaciones, equipos y elementos de laboratorio

- Los extinguidores de fuego deben estar en lugares de fácil acceso, señalizados, y en condiciones de uso.

- El laboratorio debe mantenerse limpio y organizado, libre de materiales que no tengan relación con el trabajo en el mismo.

- Se deberá contar con una fuente de fuego, mechero tipo Bunsen de gas, alcohol o similar, para generar una zona para trabajo en esterilidad

- Las ventanas y puertas deberán estar cerradas al momento de abrir cultivos.

- La mesada de trabajo deberá ser de tipo impermeable (granito, acero inoxidable, etc.).

- Los pisos, y las uniones entre la mesada y la pared, deberán contar con bordes redondeados (zócalo sanitario).

- Los tubos de ensayo con cultivos, deben ser flameados tanto al abrirse como en el instante anterior a ser tapados.

Lavado de Manos:

Las manos constituyen una de las formas más frecuentes de diseminación de microorganismos infecciosos. A través de las manos se pueden transmitir microorganismos indeseables a las personas, instrumental y alimentos. Su lavado o desinfección debe ser cuidadoso luego de trabajar en el laboratorio de microbiología, a fin de evitar la diseminación de cualquier microorganismo indeseable. En los casos que se sospecha una contaminación de manos con material microbiológico es necesaria la desinfección con soluciones desinfectantes.

Tipos de microorganismos en las manos

En las manos podemos distinguir dos categorías de microorganismos: residentes y transitorios

Microorganismos residentes son aquellos que se multiplican en la piel, por lo que las manos se convierten en fuentes de infección. Son gérmenes difíciles de eliminar por lavado o con desinfectantes. Aproximadamente el 20% se mantiene en zonas profundas de la piel cuando no se cuenta con buenas medidas de erradicación. No constituyen un problema en caso que no sean patógenos, pero pueden contaminar a los cultivos si no se trabaja adecuadamente.

Los microorganismos transitorios pueden estar presentes en la piel, pero solo por un hecho casual, ya que no es allí donde se multiplican. Su hallazgo es debido a contaminaciones recientes. Su transporte no suele superar las 48 hs. Se pueden eliminar por lavado con jabón o por tratamiento con desinfectantes.

Luego de realizar algunos trabajos microbiológicos la carga microbiana puede ser muy alta en la piel de las manos (mayor a 10^6 ufc/ml), y en estos casos se hace imperiosamente necesario realizar un lavado seguro, de lo contrario un cierto número de gérmenes puede permanecer en piel aumentando el riesgo de diseminación. Por esta razón, en caso de tener que realizar maniobras con microorganismos de riesgo es aconsejable la utilización de guantes.

Tipos de lavado de manos

Lavado higiénico: es la práctica tendiente a la remoción mecánica de microorganismos que se encuentran en la piel de la mano. Se realiza mediante el lavado con jabón no medicamentoso y posterior arrastre con agua. Remueve hasta el 99% de la flora transitoria entre 30 y 60 segundos de lavado, pero no produce muerte de los microorganismos. El lavado debe realizarse cubriendo las manos con jabón (líquido o en barra), y poca cantidad

de agua, luego debe realizarse el correcto masajeado de todas las zonas de la piel de las manos por al menos 30 segundos, y luego un cuidadoso enjuague. El secado debe realizarse con toalla descartable (para evitar la re contaminación con microorganismos presentes en la toalla de tela usada). La toalla de papel, luego de ser usada para secarse las manos, es usada para cerrar la canilla, para evitar la re contaminación de las manos con gérmenes presentes en la grifería.

Lavado antiséptico: es un procedimiento de remoción química de bacterias efectuado con soluciones antisépticas, que producen la muerte de las mismas. Es más efectivo que el lavado con jabón común. Se realiza mediante cepillado, inmersión o aspersión. El tiempo de lavado oscila alrededor de 60 segundos cubriendo toda la superficie de las manos. Los agentes antisépticos recomendados son etanol 70%, clorhexidina 4% o iodopovidona 5%. Para garantizar la eficiencia del lavado antiséptico, es recomendable realizar instantes antes un lavado higiénico, de esa manera se eliminará la materia orgánica superficial dejando más expuestos a los microorganismos al antiséptico durante el segundo lavado.

Residuos:

Las personas que generan residuos infecciosos deben responsabilizarse de los mismos. Para ello deben acondicionarlos de manera tal de minimizar el riesgo de las personas que tomen contacto directo con dichos residuos, así como la posible contaminación ambiental. En el laboratorio de microbiología se pueden generar al menos tres tipos de residuos: Similares a los domésticos, infecciosos y especiales.

Residuos equivalentes a los domésticos: No requieren manejo especial ya que no representan un riesgo. Están compuestos de papel, cartón, plásticos, maderas, alimentos, vidrios, latas, escombros, tierra. La eliminación de estos residuos a su vez, se discrimina en aquellos que son restos orgánicos como los alimentos, que se eliminan en bolsas negras; el resto, en bolsas verdes. Son retirados por la empresa que se encarga de la recolección de residuos.

Residuos infecciosos: Se los conoce como “residuos de riesgo biológico”, y son motivo de atención de las prácticas de bioseguridad, para evitar contaminar el ambiente. Presentan un riesgo potencial para el medio ambiente o la salud humana y/o animal, ya que son capaces de producir enfermedad. Se generan en procesos de atención a pacientes, diagnósticos, tratamientos, inmunizaciones, investigaciones o utilización como animales experimentales. En el caso de residuos de la clínica, muestras, cultivos microbianos, residuos patológicos deben esterilizarse previo a su destino final. Se reconocen este tipo de residuos por ser eliminados en bolsas rojas. En el caso de elementos punzo-cortantes deben acondicionarse en recipientes de plástico con tapa o descartadores para tal fin, para evitar el riesgo agregado por accidente traumático al preexistente por transporte mecánico de un agente infeccioso. Son retirados por el personal de la institución que los genere para su incineración.

Residuos especiales: Este grupo está integrado por agentes químicos, antineoplásicos, radioactivos, etc. Son elementos químicos que implican un elevado riesgo individual y

considerable riesgo ambiental. No deberían eliminarse al ambiente, por el contrario, se debe eliminar en bolsas de color naranja. Son retiradas y destruidas por un operador habilitado por la autoridad nacional competente (Secretaría de Política y Evaluación Ambiental).

TRANSPORTE DE MATERIAL INFECCIOSO DE RIESGO BIOLÓGICO:

Toda muestra debe ser acondicionada para su envío, por las vías de comunicación habituales, para llegar al laboratorio de destino en condiciones de contención biológica adecuada. Para este fin se consideran envases de contención con tres barreras. Estas barreras deben asegurar la impermeabilidad del contenido, resistencia a pinchaduras, rígidos a prueba de pérdidas. Los recipientes deben ser acondicionados para soportar golpes sin pérdida de contenido. Su identificación debe ser clara y fácilmente identificable. Durante el transporte debe existir un teléfono y nombre de referencia para comunicarse con el responsable que determine las medidas a seguir en caso de accidente.

La normativa para el transporte seguro de sustancias infecciosas y muestras para diagnóstico de la OMS se basa en las recomendaciones de la UNCE (Comité de expertos en transportes de Mercancías peligrosas de Naciones Unidas), que integra 23 países incluyendo la Argentina. (Ver Anexo 1: “Instrucciones para el envío de muestras y materiales infecciosos”, Depto. Bacteriología Inst. Carlos G. Malbrán”, 1998).

Cuestionario de autoevaluación:

- a) ¿Por qué razón se han utilizado a los microorganismos como modelo experimental, para conocer procesos metabólicos de organismos superiores multicelulares?
- b) ¿Por qué es importante la presencia de microorganismos benéficos en organismos multicelulares evolucionados como los animales? ¿Qué funciones cumplen estos microorganismos benéficos?
- c) ¿Por qué es importante la presencia de microorganismos saprofitos en el ambiente? ¿Qué funciones cumplen estos microorganismos saprófitos? Proponga a manera de hipótesis, la desaparición de un grupo de microorganismos saproifitos y cual sería el efecto en la salud del ecosistema donde pertenecen dichos microorganismos saprófitos
- d) ¿Qué dice la teoría de la generación espontánea de la vida? ¿Quién, cuándo y cómo la desterró para siempre en los medios académicos?
- e) ¿Cuáles fueron los principales aportes de Koch a la microbiología? Describa y explique los famosos postulados de Koch.
- f) ¿La pasteurización es un método de esterilización? Justifique su respuesta.
- g) ¿Qué es una vacuna? Mencione un ejemplo histórico y explíquelo (vacuna de la rabia, de la viruela humana o de la peste aviar).
- h) Defina “cultivo microbiano puro o en pureza”, y explique de que maneras se pueden obtener y cuál de ellas es más sencilla.
- i) Realice un gráfico de un posible laboratorio de microbiología, a manera de plano visto desde arriba, indicando las áreas diferenciadas de trabajo que, según lo leído en este apunte y su criterio, deberían estar bien diferenciadas.
- j) ¿Cómo se clasifican los microorganismos, considerando los riesgos para el operario y para el ambiente? Busque en internet un ejemplo de bacteria y otro de virus para cada grupo de riesgo de microorganismos
- k) ¿Qué es la bioseguridad? Mencione 10 acciones bioseguras que no pueden faltar durante el trabajo en un laboratorio de microbiología.
- l) Mencione 10 acciones bioseguras que no pueden faltar durante el trabajo a campo, manipulando una muestra que puede constituir una posible fuente de infección de alguna zoonosis.