



# IICA



## NORMAS DE BIOSEGURIDAD DEL SISTEMA NACIONAL DE LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO VETERINARIO

Dr. ELMO DE LA VEGA

**COOPERACION TECNICA IICA-MAGA  
CONTRATO ADMINISTRATIVO 02-84**

MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA Y ALIMENTACION  
DIRECCION GENERAL DE SERVICIOS PECUARIOS  
PROGRAMA DE SANIDAD ANIMAL

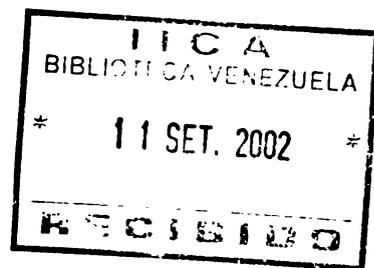


**IICA**  
BIBLIOTECA VENEZUELA  
\* 11 SET. 2002 \*  
**RECIBIDO**

11  
270  
7

00007176

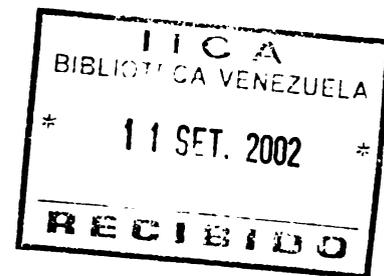
0210 -



**NORMAS DE BIOSEGURIDAD DEL SISTEMA  
NACIONAL DE LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO  
VETERINARIO**

**Dr. Elmo de la Vega  
Consultor en Administración  
de Laboratorios**





## INDICE

	PAGINA
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	2
PRINCIPIOS BASICOS DEL CONTROL DE CONTAMINACION	5
PROTECCION PERSONAL	9
CONTROL DEL RIESGO BIOLÓGICO	11
DESCONTAMINACION Y ESTERILIZACION	14
CONTROL DE RIESGOS DURANTE EL MANEJO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION	20
MANIPULACION, TRANSPORTE Y ENVIO DE MUESTRAS	22
PROCEDIMIENTOS DE EMERGENCIA	24
NORMAS DE BIOSEGURIDAD	25
ESTERILIZACION Y DESINFECCION	31
REFERENCIAS	47



**NORMAS DE BIOSEGURIDAD DEL SISTEMA  
NACIONAL DE LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO  
VETERINARIO**

**INTRODUCCION**

Habida cuenta que en los laboratorios de diagnóstico y/o producción de biológicos se trabaja con agentes patógenos para el hombre y por lo tanto representan peligro potencial de contaminación, es obligatorio establecer normas de seguridad biológica cuyo fin es proteger a las personas que trabajan en áreas de riesgo de contaminación, así como también asegurar la protección del medio externo para prevenir posibles accidentes que puedan afectar a personas ajenas al laboratorio.

Las normas de bioseguridad que existen en muchos laboratorios del mundo se presentan bajo las denominaciones de manuales o recomendaciones de bioseguridad y no como reglamento, y esto se debe a que en todo momento los responsables del funcionamiento de un laboratorio están obligados a despertar y estimular, en el personal a su cargo, la necesidad de adoptar las normas de bioseguridad que aseguran, en el desempeño de sus labores, la protección de sí mismos y de los miembros de la comunidad.

En el presente manual el lector encontrará principios generales, sobre riesgos biológicos, la manera de evitarlos ya sea por medio del uso de prácticas, equipos, ropa y materiales adecuados; se describen métodos de desinfección, desinfectantes, así como también los riesgos a los que se expone un trabajador que maneje animales de experimentación y como pueden evitarse.

Luego se consignan las principales normas de trabajo dentro del laboratorio, muchas de las cuales se han tomado del manual de Bioseguridad en el laboratorio editado por la Organización Mundial de la Salud, por considerar que este se adapta a las condiciones de trabajo, instalaciones, etc. que caracterizaran al Sistema de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario de Guatemala.

Por último se adjunta el capítulo, más detallado sobre esterilización y desinfección, que preparó el Dr. Francisco Suárez Guemes, en el curso de bioseguridad que se impartió al personal del Laboratorio Central.



## GENERALIDADES

Los laboratorios de diagnóstico y/o preparación de biológicos en general han sido considerados como lugares seguros de trabajo si se comparan con otros, como fábricas, talleres, etc.; sin embargo, en los laboratorios pueden y de hecho ocurren accidentes, debido al peligro potencial que representa el manejo de productos o agentes químicos, físicos, biológicos o radiológicos.

Se dan múltiples definiciones de accidentes pero para nuestro propósito definiremos accidente como cualquier incidente no esperado que trastorna el trabajo en el laboratorio. Veamos ahora los peligros a los que se expone el personal de un laboratorio.

### Peligros Físicos

Entre estos se consideran caídas por tropezones o resbalones en un piso mojado, pinchazos con agujas o cortes con vidrios rotos o con cuchillos, bisturi, etc., que suelen ocurrir en el trabajo diario. Frecuentemente ocurren quemaduras ya sea con objetos calientes como frascos con agua en ebullición, autoclaves o con la llama de los mecheros, así mismo pueden ocurrir quemaduras por exposición prolongada a rayos de luz ultravioleta. Los incendios pueden destruir los laboratorios o inutilizarlos por varios meses.

### Peligros Químicos

Muchas de las sustancias químicas pueden ser tóxicas, por ejemplo: el cianuro y fenol que pueden causar la muerte rápidamente después de la exposición. Otros químicos pueden reaccionar muy lentamente en el organismo, pero después de un tiempo prolongado de exposición producen cambios patológicos a veces irreversibles por ejemplo el cloroformo por exposición prolongada daña al tejido hepático. Los ácidos inorgánicos fuertes y los álcalis son peligrosos por su bajo punto de ignición o explosión de tal manera que pueden causar incendios fácilmente por ejemplo, el éter, alcoholes, acetona, etc.

Unos pocos químicos usados en el laboratorio son inestables o pueden formar compuestos inestables, son ejemplos los percloratos, peróxidos o ácido picrico sólido, todos los cuales pueden explotar fácilmente. Por lo expuesto deben conocerse las características y propiedades de las sustancias químicas usadas en el laboratorio de tal manera que se puedan tomar las medidas de seguridad adecuadas en casos de emergencia así como las precauciones para evitar accidentes.

### Peligros Microbiológicos

Como es bien sabido ciertos microorganismos con los que se trabaja en el laboratorio pueden causar problemas de salud, a veces graves, en el hombre ya sea por que desencadenan un proceso



infeccioso o tóxico, sólo para citar algunos ejemplos mencionaremos la brucelosis, tifoidea, botulismo, rabia, etc.

### **Peligros Radiológicos**

La introducción de radio isótopos en las técnicas de laboratorio, han incrementado los peligros en los laboratorios de diagnóstico. Muchos radio isótopos usados en el laboratorio son de baja energía y por tanto de menos riesgo a menos que se ingieran o inhalen. Algunos de estos radio isótopos pueden tener afinidad selectiva sobre determinada estructura del organismo y producir daño estructural y funcional, por ejemplo, el Iodo-radioactivo sobre la glándula tiroides.

Muchos de estos peligros pueden ser minimizados por:

- a) Uso de prácticas apropiadas.
- b) Uso de artículos de contención.
- c) Uso de equipo de protección personal. Si nos referimos a los peligros microbiológicos diremos que las infecciones asociadas con el trabajo en un laboratorio han ocurrido desde los tiempos en que se comenzó a estudiar la microbiología, estas infecciones además pueden terminar con la muerte del sujeto, para señalar sólo algunos ejemplos mencionaremos: La enfermedad de Marburgo o de los monos verdes, las infecciones típicas, brucelosis, etc.

A diferencia de los accidentes con productos químicos o físicos fácilmente identificables, a menudo es difícil determinar si una persona adquirió determinada enfermedad en el laboratorio, es decir, una persona puede manifestar síntomas muchos días o semanas después de haberse expuesto y sin embargo no asocia su mal con la infección en su recinto de trabajo. Por consiguiente es razonable pensar que en el laboratorio se producen muchas más infecciones accidentales que las reportadas.

En 1976 el Dr. Pike publicó las infecciones contraídas en los laboratorios como accidentes de trabajo señalando que en el lapso comprendido entre 1924-1974 se registraron 3,921 casos. Es interesante así mismo señalar que en este informe, entre las bacterias causantes del mayor número de accidentes se encontraban la brucelosis, tularemia, tuberculosis y fiebre tifoidea, entre las virosis están la rabia, hepatitis, fiebre de lassa, enfermedad de Marburgo etc. Sobre rickettsias estaría la fiebre Q., fiebre de las montañas rocosas; y entre las parasitosis, la hidatidosis, enfermedad de Chagas, paludismo, etc. En años recientes se han agregado accidentes trabajando con sífilis, gonorrea, coccidioidomicosis, mononucleosis infecciosa y coriomeningitis linfocítica.

Veremos ahora como se infecta una persona en el laboratorio. Si una persona se infecta o no con una determinada enfermedad depende de 2 factores interrelacionados: a) como llega el microorganismo a una persona susceptible, y b) la resistencia del huesped.



Transmisión de enfermedades. En las infecciones naturales, el microorganismo debe encontrar su vía de entrada al cuerpo susceptible; en el laboratorio sin embargo, el agente sólo necesita escapar del tubo de prueba y encontrar su vía de entrada al organismo ya sea por vía respiratoria, digestiva, mucosa, cutánea etc.; con el agravante de la mayor virulencia del microorganismo cultivado, pues mientras en la infección natural se requiere que el huésped debe entrar en contacto con sangre, heces, orina, secreciones, etc., en el laboratorio sólo necesita escapar del medio de cultivo del animal inoculado, de un medio de seguridad malogrado, etc.

Luego que el agente ingresa al cuerpo del huésped, si la enfermedad se desarrolla o no depende de:

1. Virulencia del agente.
2. Tamaño del inóculo.
3. Resistencia natural del huésped.
4. Resistencia modificada del huésped.

#### Resistencia del Huésped.

La resistencia natural o innata contra una infección es una respuesta compleja en la que interactúa el organismo específico que busca su entrada en el huésped. La piel sirve como una barrera efectiva contra las infecciones ya que relativamente pocos micro-organismos logran atravesar la piel. Por otra parte, cada orificio del cuerpo tienen sus propios mecanismos de defensa tales como: secreciones, mucosas, los cilios celulares o enzimas. Si la corriente sanguínea o tejidos son alcanzados por microorganismos patógenos actúan rápidamente los fagocitos o células de defensa orgánica. Algunos tejidos aún son más susceptibles que otros por ejemplo el pneumococo no infecta el tracto intestinal, mientras que el bacilo de la tifoidea generalmente no causa neumonía.

Luego de la exposición a un microorganismo, la resistencia del hospedero puede ser modificada o alterada. Generalmente la exposición es seguida por una respuesta de elaboración de anticuerpos. Sería ideal que la resistencia aumentara con la producción de anticuerpos, lamentablemente esto no siempre ocurre. Puede haber además alteración de otros sistemas del cuerpo que modifican la resistencia. Por tanto debe tenerse presente que la exposición a un organismo es seguida por un amplio espectro de reacciones que pueden ir desde la adquisición de inmunidad completa hasta un cambio o respuesta no reconocible.



## PRINCIPIOS BASICOS DE CONTROL DE CONTAMINACION.

La contaminación del ambiente en el laboratorio y la subsecuente exposición de una persona que trabaja en él puede resultar en enfermedad o muerte.

La contaminación puede ser definida como la presencia de partículas peligrosas o indeseables en una área a la que no pertenecen. Los contaminantes pueden ser bióticos o abióticos. Las partículas contaminantes no viables pueden ser tóxicos, químicos o polvo radio-activo. Estas partículas de acuerdo a su concentración pueden causar enfermedad o muerte. Afortunadamente después de su escape al ambiente la concentración no aumenta sino que por el contrario decrece luego de un corto periodo dependiendo de la temperatura, humedad y velocidad del aire.

Los contaminantes vivos representan un problema particular ya que ellos pueden crecer y multiplicarse bajo condiciones favorables, y a menudo su concentración alcanza altos niveles en el laboratorio. Su control sin embargo, puede alcanzarse fácilmente, mediante aplicación de agentes letales, físicos o químicos.

La prevención de la contaminación es un principio básico que debe tenerse siempre presente. La inversa de la contaminación es la exclusión en la cual la contaminación del área de trabajo desde fuera debe de ser prevenida, tal cosa ocurre en cultivos. Contaminación y exclusión deben llevarse a cabo simultáneamente.

Los procedimientos técnicos para el control de la contaminación a menudo pueden ser alcanzables o dominados por otras consideraciones. Otros factores pueden ser de orden económico, social, político o psicológico.

Existen muchos medios para alcanzar el control de la contaminación, estos incluyen:

1. Reconocimiento del problema
2. Evaluación: que es, cual es su riesgo
3. Prescripción: técnicas de control, equipo y procedimientos.
4. Pruebas de vigilancia: Determinar si sus controles son efectivos.
5. Análisis y certificación.

Los laboratorios, según sus características de diseño construcción y medios de contención o prevención de accidentes se dividen en: Laboratorio básico, laboratorios de contención y laboratorio de contención máxima; de otro lado los microorganismos de acuerdo con el riesgo que entrañan se clasifican por grupos de riesgo en: grupo de riesgo I, II, III y IV.

Los del Grupo de riesgo I, son aquellos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades humanas o enfermedades en los animales.



Grupo de riesgo II. Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o enfermedades en los animales pero tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la comunidad, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave pero se dispone de medios eficaces de prevención y tratamiento y el riesgo de propagación es limitado.

Grupo de riesgo III. Agentes patógenos que provocan enfermedades humanas graves pero que de ordinario no se propagan de una persona infectada a otra.

Grupo de riesgo IV. Agentes patógenos que provocan enfermedades graves en las personas o en los animales y pueden propagarse fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente.

El Cuadro 1 muestra los grupos de riesgo en relación con el tipo de laboratorio.

Cuadro No. 1  
GRUPOS DE RIESGO EN RELACION CON EL TIPO DE LABORATORIO

Grupo de riesgo	Clasificación del Laboratorio	Ejemplos de Laboratorio	Ejemplo de Microorganismos
I Escaso riesgo individual y comunitario	Básico	Enseñanza Básica	B. subtilis E. coli K12
II Riesgo individual moderado y riesgos comunitario limitado	Básico con cámaras de Bio-seguridad o si es necesario otros dispositivos apropiados de protección personal	Servicios primarios de salud hospital de nivel primario, los laboratorios de diagnóstico, enseñanza U.	Salmonella typhi Virus de hepatitis B. Mycobact. TBC(a) Virus CMV (b)
III Riesgo individual elevado Riesgo comunitario exceso	Contención	Laboratorio de diagnóstico, especializado	Brucella spp. Virus de la fiebre de lasa Histoplasma capsulatum
IV Elevado riesgo individual y comunitario	Contención máxima	Laboratorios que trabajan con agentes patógenos peligrosos	Virus de Marburgo Virus de la fiebre aftosa

(a) Cuando se utilizan grandes cantidades o concentraciones elevadas, o cuando las técnicas conllevan la producción de aerosoles, y otros agentes deben trasladarse al grupo de riesgo III.

(b) Comprende laboratorios de investigación en el nivel apropiado de grupo de riesgo.



## Precauciones en Microbiología.

Control de infecciones por aerosoles. En el laboratorio de microbiología se practican acciones que puedan producir aerosoles contaminantes, estos incluyen: Uso inapropiado de las pipetas, durante la inoculación o sembrado; y el uso de jeringas y agujas. Los aerosoles cuyo tamaño es mayor de 5 micrometros, se asientan rápidamente y solamente contaminan las superficies o áreas circundantes; en cambio los aerosoles cuyos tamaños son menores de 5 micrometros permanecen suspendidos en el aire por varias horas y pueden ser inhalados fácilmente. Además son de tamaño óptimo para penetrar a los alveolos del pulmón y establecer ahí una infección.

Por tanto el uso apropiado de estas herramientas de laboratorio reducirán grandemente los peligros biológicos en el laboratorio.

## Contenedores de Aerosoles Infecciosos.

Los homogenizadores son particularmente peligrosos, cuando se usan para homogenizar material infeccioso debido al alto nivel la energía que imparte a la suspensión. La remoción de la tapa inmediatamente después homogenizar permite el escape de innumerables partículas de material infeccioso. Aún después de 1 hora de reposo, muchos microorganismos pueden ser liberados.

La centrifuga también desarrolla altos niveles de energía de tal suerte que un accidente que suponga un goteo a partir de los tubos o una rotura del tubo liberarán aerosoles infectantes que pueden permanecer suspendidos en el aire y pueden ser diseminados a muchos metros desde el lugar de la centrifuga. Estos peligros potenciales cuando se usa la centrifuga con material infeccioso, pueden ser reducidos o prevenirse por el uso de cubetas de seguridad. Pero como en el caso del homogenizador, sin embargo, las cubetas de seguridad deben abrirse solo dentro de una cámara de seguridad biológica.

Las cámaras de seguridad biológica pueden ser: de Clase I, que es una cabina de presión negativa, es decir, el aire va hacia el interior de la cámara a través de una abertura frontal. Tiene suficiente filtración de aire. El aire expulsado pasa a través de un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) que está diseñado para remover 99.9 % de partículas del tamaño de 0.3 micrones. Por detrás del filtro se encuentra un dispositivo con luz ultravioleta de fuerte intensidad que inactiva cualquier partícula que pueda pasar el filtro.

La cabina Clase II o de flujo vertical también proporciona una barrera de aire por flujo a través de una abertura frontal a una velocidad promedio de 33 metros por minuto. Aproximadamente 10-20% del aire es expulsado y el resto es recirculado a través de filtros HEPA dentro de la cámara de trabajo. Esta cabina tiene la ventaja de proporcionar un ambiente de trabajo casi estéril. En cualquier tipo de cabina, el trabajo será bien planeado para



evitar mantener en función la cámara mucho tiempo y prolongar de este modo la vida del filtro.

### Prácticas de Control de Riesgos en el Laboratorio.

El fumar, comer y beber en el laboratorio crean un riesgo innecesario. Es muy fácil contaminarse las manos, cuando uno está trabajando, luego si uno toma con las manos sucias la colilla del cigarro por ejemplo, el material infeccioso puede llegar a la boca. En la misma forma se puede infectar una persona que coma dentro del laboratorio; el beber sin embargo, es menos riesgoso. Así mismo se debe tener cuidado de mantener los dedos lejos de la cara mientras se trabaja con material infeccioso.

El oler los cultivos es una mala práctica a pesar que algunas bacterias dan un olor distinto como resultado de su metabolismo. Un laboratorio desordenado conduce a accidentes.

Es fácil romper una caja con material contaminado y si el laboratorio está en desorden la limpieza se dificulta. Se deben mantener sobre la superficie de trabajo solamente las cosas que uno está utilizando. Es muy útil si uno trabaja sobre una toalla impregnada con jabón desinfectante. Hay que tener mucho cuidado cuando se transfieren cultivos para evitar que se derramen. Es importante lavar frecuentemente la mesa de trabajo y las superficies por debajo de la misma.

Los materiales que serán descartados deben colocarse en contenedores sólidos. Estos deben ser identificados. Los vidrios de placas, tubos, etc., rotos serán descartados inmediatamente para prevenir posibles contaminaciones. Se debe minimizar el apilamiento de cajas de petri con material infeccioso para evitar se caigan y se rompan.

En lo posible debería descartarse el uso de lentes de contacto en el laboratorio; así mismo es un peligro lucir pelo largo, el cual es fácil presa de las llamas. Pueden ocurrir quemaduras por mal manejo de medios de cultivo calientes, así como quemaduras en los ojos y piel producidas por fuentes de luz ultravioleta.

Es muy importante acostumbrarse a lavarse las manos frecuentemente mientras se trabaja en el laboratorio.



## PROTECCION PERSONAL.

Para prevenir la contaminación de la ropa de calle, quien trabaja en el laboratorio debe usar vestimenta que proteja esta ropa. Es mejor usar la bata que se abotona en la región de la espalda; pues aquellas que lucen botones en la parte delantera no protegen bien.

Cuando se manipula material infeccioso se deben usar guantes de hule sobre todo es indispensable su uso cuando se destapan tubos con sangre.

Si el laboratorio en que se trabaja es de contención máxima, es necesario lucir cubiertas desechables para calzado, pero no son necesarios en los laboratorios básicos o en los de contención.

Frecuentemente, es aconsejable lucir máscara protectora que cubra la nariz y boca. Las cubiertas protectoras de la cabeza generalmente se usan en laboratorios en los que se manejan patógenos extremadamente peligrosos.

Para protección de los ojos se usan lentes simples o complejos que bloquean completamente la cara. Existen también antiparras con los costados, sólidos o perforados y máscaras parciales que cubren sólo boca y nariz.

La protección personal también incluye muchas clases y estilos de aparatos mecánicos. Entre estos podemos mencionar bulbos de hule simple, bulbos con salida controlada de líquido (ambos para usar con pipetas). Variedad de jeringas y sus modificaciones, algunos con volumen fijo. Otras con volumen variable. Algunas de las pipetas más sofisticadas son operadas eléctricamente.

Entre los sistemas de protección personal también debemos citar las duchas y facilidades para el lavado de ojos, cuando se producen accidentes,. Algunas duchas deberán estar cerca al área de trabajo. Las duchas diseñadas para uso en los laboratorios se abren jalando simplemente una cadena. Estas duchas deben descargar suficiente volumen de agua (200 litros aproximadamente) antes de que se cierre la válvula de seguridad.

Los aparatos para lavado de ojos son de diferentes tipos. Uno de los modelos tiene dos aberturas de tal modo que lavan ambos ojos. Otro modelo puede estar conectado a un caño de agua en el laboratorio y se abre mediante una válvula, arrojando agua pulverizada a ambos ojos. Por último un tercer modelo consiste de una bombilla de hule con una abertura que lava solamente un ojo.

La protección personal así mismo se suministra por inmunización activa, aunque este es un aspecto de protección a menudo no bien comprendido. Un trabajador de laboratorio debe tener siempre presente que la inmunización es indispensable



cuando uno está en permanente peligro de contaminación. A parte de las inmunizaciones que se suministran en la infancia tales como: difteria, pertusis, paperas, tétano, sarampión, etc. los trabajadores de laboratorio deben vacunarse contra rabia y aplicarse toxoide botulinum, sobre todo cuando se trabaja con estos agentes infecciosos. Asimismo, se debe tener plena conciencia que la inmunización no significa protección total de una persona; es necesario sobre todo buenos procedimientos de trabajo y constante higiene personal.

Por último es necesario enfatizar la constante vigilancia médica de los trabajadores, para detectar tan pronto como sea posible, a los empleados enfermos. Esta vigilancia incluye ausencia del funcionario, y si la ausencia se produjo por síntomas de enfermedad así como si el funcionario visit o no al médico cuando se sintió indispuesto.



## CONTROL DEL RIESGO BIOLÓGICO.

### Barreras, primarias y secundarias.

El término "contención" se usa para describir métodos de manejo de agentes infecciosos en el ambiente de laboratorio en el cual estos agentes son manipulados o mantenidos. El propósito de la contención, es reducir el peligro de exposición a agentes potencialmente peligrosos tanto a trabajadores de laboratorio, otras personas, así como al medio ambiente externo.

La protección del personal así como del ambiente de laboratorio inmediato al lugar de trabajo se consigue mediante el uso de técnicas apropiadas de trabajo así como con equipo de seguridad. La protección de todo el ambiente de laboratorio así como el ambiente exterior, se logra mediante la combinación de diseños apropiados de locales y facilidades y prácticas de su operación.

Por tanto los elementos de contención incluyen: prácticas de laboratorio, equipo de seguridad y diseño de locales apropiados.

### TECNICAS Y PRACTICAS DE LABORATORIO

El elemento más importante de contención es el estricto cumplimiento de las técnicas y prácticas estandarizadas de laboratorio. Las personas que trabajan con agentes infecciosos o material infectado deben ser conscientes del peligro potencial al que están expuestos y por tanto deben ser adiestrados sobre las técnicas y prácticas requeridas para el manejo seguro de estos materiales.

Cuando las prácticas corrientes de laboratorio no son suficientes para controlar los peligros asociados con un agente infeccioso particular, se deben tomar medidas de seguridad adicionales. La selección de estas prácticas de seguridad adicionales, es responsabilidad del supervisor de laboratorio y debe ser medida con el riesgo del agente asociado con el procedimiento que se usa para su manipuleo.

Cada laboratorio debe desarrollar o adaptar un manual de operaciones y seguridad que identifique los peligros potenciales y que especifique las medidas destinadas a minimizar o eliminar tales riesgos.

El personal debe ser alertado de los peligros especiales y exigirle leer y seguir las prácticas requeridas para evitarlos.

### Equipo de Seguridad.

El equipo de seguridad comprende: cámaras de bioseguridad y varios contenedores incluidos. Las cámaras de bioseguridad son los dispositivos usados para contener los aerosoles infecciosos generados por muchos procedimientos microbiológicos. En los laboratorios de microbiología se usan 3 tipos de cámaras de



contención parcial que ofrecen niveles de protección significativo al personal de laboratorio y el ambiente, cuando son usadas junto con técnicas apropiadas de manipulación.

La cámara de seguridad biológica de clase III provee el más alto nivel de protección para las personas y ambiente.

El equipo de seguridad también comprende o incluye artículos para la protección personal tales como, sacos, botas, cubrecalzado, botas, máscaras y lentes de seguridad. Estos artículos de seguridad personal son a menudo usados en combinación con cámaras de seguridad biológica y representan la barrera primaria entre la persona y el material infeccioso. Como ejemplo de lo dicho se puede citar el manipuleo de animales de experimentación, de necropsia de animales muertos, actividades de producción de biológicos, de mantenimiento, servicio, etc.

### **Las Facilidades de Laboratorio.**

El diseño de las facilidades físicas de un laboratorio es un punto crítico para suministrar protección a personas fuera del laboratorio y a la comunidad, en el caso eventual de que un agente infeccioso se libere accidentalmente del laboratorio. Es por tanto, responsabilidad de quien maneja el laboratorio indicar las medidas mínimas de protección para de este modo al diseñar los ambientes físicos sean tomadas en cuenta de acuerdo con la función que será asignada al ambiente. A continuación se describen cuatro clases de diseño en orden ascendente por el nivel de contención.

1. **Laboratorio Básico.** Este tipo de laboratorio proporciona un espacio apropiado para trabajar con agentes biológicos que no están asociados con procesos morbosos en adultos sanos o que no colonizan en seres humanos. Todas las actividades son generalmente ejecutadas en ambientes abiertos usando prácticas de laboratorio garantizadas.
2. **Laboratorio de Contención.** Este laboratorio provee espacio apropiado para trabajar con agentes infecciosos o materiales potencialmente infecciosos, cuando los niveles de peligro son bajos y el personal de laboratorio puede ser adecuadamente protegido por prácticas garantizadas de trabajo. El trabajo generalmente es ejecutado en ambientes abiertos con ciertas operaciones realizadas en cámaras de seguridad biológica. El diseño de laboratorios convencionales concuerda con el descrito. En estos las áreas conocidas como fuentes de contaminación general tales como los ambientes para animales o depósitos de basura no deben ser adyacentes a las áreas de preparación de medios, laboratorios de cultivos celulares, o actividades de cuidado de pacientes. Las áreas de oficinas frecuentadas por personal ajeno al laboratorio deben de estar separados de las áreas de trabajo y aún de los de apoyo al laboratorio.



3. **Laboratorio de alta contención.** Este laboratorio tiene aspectos especiales de ingeniería que hace posible que los trabajadores manejen materiales peligrosos sin comprometer su propia seguridad, ni la de la comunidad o medio ambiente.

El único aspecto que diferencia este laboratorio de los básico o de contención son los controles de acceso y un sistema especial de ventilación. El laboratorio de alta contención puede ser un edificio o un simple módulo o un complejo de módulos dentro de un edificio. En cualquiera de los casos, el laboratorio está separado por una zona de acceso controlado, para el personal que trabaja en él, separada de otras áreas abiertas al público ajeno al laboratorio.

4. **El laboratorio de máxima contención.** Este laboratorio tiene aspectos especiales de ingeniería y contención que permitirá la conducción segura de actividades que involucran agentes infecciosos que son extremadamente peligrosos para el laboratorista o que pueden producir enfermedades epidémicas. Aunque el laboratorio de contención máxima es un edificio generalmente separado, puede ser construido como una área aislada dentro de un edificio.

La característica que lo distingue de los anteriormente mencionados es la provisión de barreras secundarias para prevenir el escape de material peligroso al ambiente. Tales barreras incluyen sellado de las aberturas, en el laboratorio, instalación de barreras de aire, barreras de desinfectante líquidos, contiguas a ambientes de cambio de vestimenta y ducha; autoclaves de doble puerta, sistema de tratamiento de desechos biológicos, sistemas separados de ventilación y sistema de tratamiento para descontaminar el aire viciado.



## DESCONTAMINACION Y ESTERILIZACION

Todos los materiales contaminados deben ser sometidos a medidas de seguridad antes de disponer de ellos. Los laboratorio (o casi todos) tienen ahora incineradores de tal modo que toda la basura combustible, incluyendo la basura contaminada puede ser eliminada con seguridad. Para la incineración el material será colocado en una bolsa plástica fuerte y este contenedor colocado dentro el incinerador.

El material para ser eliminado de cualquier otra manera debe ser autoclavado a 121 grados C. por 45-60 minutos antes de eliminarlo.

### Métodos de Desinfección.

Los medios de desinfección físicos y químicos son principalmente: calor, desinfectantes líquidos, vapor y gases.

- a) **Calor.** La aplicación de calor, seco o húmedo, es recomendado como el método más efectivo de esterilización. El vapor a 121 grados C. bajo presión en el autoclave es el método más conveniente de alcanzar una rápida esterilidad. El calor seco a 160 grados C. ó 170 grados C. por períodos de 2 a 4 horas es adecuado para destruir agentes vivos que estén sobre material impermeable no orgánico como vidrio, pero no es confiable en casos de finas láminas de material orgánico o inorgánico que puedan actuar como aisladores.

La incineración mata microorganismos y sirve como un medio eficiente para eliminar material contaminado.

- b) **Desinfectantes líquidos.** En general, los desinfectantes líquidos tienen su uso más práctico en el tratamiento de superficies, y en concentraciones suficientes como esterilizante de desechos líquidos antes de arrojar estos a los sistemas de desagüe.

Existen muchas equivocaciones respecto al uso de desinfectantes líquidos. Esto es debido en gran parte a la característica capacidad de tales líquidos de actuar dramáticamente en el tubo de prueba y fallar miserablemente en situaciones prácticas de desinfección. Estas fallas ocurren a menudo por que no se dan las consideraciones debidas a factores como temperatura tiempo de contacto, pH, concentración, y la presencia y estado de dispersión, penetrabilidad y reacción de material orgánico en el lugar de aplicación. Una pequeña variación en los factores mencionados pueden producir una gran diferencia en la efectividad de la desinfección. Por esta razón, aún cuando se usan bajo condiciones altamente favorables no se debería tener confianza en desinfectantes líquidos cuando el resultado final debe ser la esterilidad.



Hay muchos desinfectantes líquidos disponibles bajo una amplia variedad de marcas y nombres. En general, estos pueden ser caracterizados como halógenos, ácidos o álcalis, sales de metales pesados, cetonas, alcoholes y aminas, compuestos de amonio cuaternario, y compuestos fenólicos y aldehídos. Desafortunadamente, los desinfectantes más activos a menudo poseen características indeseables, como propiedades corrosivas.

- c) Gases y vapores. Gran variedad de gases y vapores poseen propiedades germicidas. Los más útiles de estos son el formaldehído y el óxido de etileno. Cuando estos pueden ser empleados en sistemas cerrados y bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, se puede alcanzar la esterilización. Los vapores y gases desinfectantes son principalmente útiles en esterilización:
- i) Cabinas biológicas asociadas con sistemas de manejo de aire afluyente y filtros de aire.
  - ii) Equipos voluminosos o estacionarios en los que no se puede usar desinfectantes líquidos de superficie.
  - iii) Instrumentos que pueden ser dañados, por otros métodos de esterilización y
  - iv) Cuartos y edificios.

**Características de desinfectantes químicos de uso en operaciones de laboratorio.**

Aquellas personas que trabajan con microorganismos encontrarán necesario desinfectar las áreas de trabajo, materiales, equipo e instrumentos especializados mediante métodos químicos. La desinfección química es necesaria porque el vapor presurizado, el método más confiable de esterilización, normalmente es factible para desinfectar grandes espacios, superficies y equipo estacionario. Además las altas temperaturas y humedad a menudo malogran instrumentos delicados, particularmente aquellos que tienen complejos ópticos y/o componentes electrónicos.

Los desinfectantes químicos están disponibles bajo la forma de polvo, cristales, líquidos concentrados o gases comprimidos. Los desinfectantes químicos que son gaseosos a temperatura ambiente pueden ser útiles como desinfectantes de espacios. Otros pueden llegar al estado gaseoso a una temperatura razonablemente elevada y pueden actuar ya sea como desinfectantes acuosos de superficie o como desinfectantes gaseosos de espacios.

La inactivación de microorganismos por desinfectantes químicos puede producirse por una o más de las siguientes vías: I. Coagulación y desnaturalización de la proteína; II Lisis; III Inactivación de una enzima esencial ya sea por oxidación, ligazón, o destrucción del sustrato enzimático. La resistencia



relativa a la acción de desinfectantes químicos puede ser substancialmente alterada por factores como: concentración de ingredientes activos, duración de contacto, temperatura, humedad y presencia de materia orgánica.

Dependiendo de como se manipulen estos factores, el grado de éxito alcanzado con los desinfectantes químicos puede variar de inactivación mínima de microorganismos a esterilidad, dentro de los límites de sensibilidad de los sistemas empleados.

Existen docenas de desinfectantes disponibles bajo una amplia variedad de marcas y nombres. En general, estos desinfectantes pueden clasificarse como: ácidos o álcalis, halógenos, sales de metales pesados, compuestos de amonio cuaternario, compuestos periódicos, aldehidos, cetonas, alcoholes y aminas. Desafortunadamente, el desinfectante más activo, el más prometedor, tiene características no deseables. Por ejemplo, el ácido peracético es un germicida universal de acción rápida; sin embargo cuando está concentrado es un compuesto peligroso que puede fácilmente descomponerse con violencia explosiva. Cuando se diluye tiene una corta vida, produce un fuerte olor picante e irritante y es extremadamente corrosivo para los metales. No obstante este es un germicida tan bueno que es comunmente usado en estudios con animales libres de gérmenes a despecho de sus características indeseables.

Los halógenos son un grupo de desinfectantes más activos. El cloro, yodo, bromo, y fluor matan rápidamente, esporas de bacterias, virus, rickettsias y hongos. El agente efectivo es el halógeno libre. Estos desinfectantes son efectivos sobre amplios límites de temperaturas. Los halógenos tienen muchos aspectos indeseables. Se combinan fácilmente con proteínas, de tal manera que si está presente material proteico debe usarse un exceso de halógenos. Así mismo, los halógenos son algo inestables especialmente a niveles bajos de pH de tal manera que las soluciones deben prepararse para uso inmediato. Finalmente, los halógenos son corrosivos para los metales. Por estos motivos los fabricantes de desinfectantes modifican las fórmulas para hacer compuestos de halógenos más estables, no tóxicos, inodoros y menos corrosivos para metales. Estos compuestos "amortiguadores" sin embargo disminuyen su efectividad germicida.

La ineffectividad de un desinfectante es debida casi siempre a la falla del desinfectante de contactar al micro-organismo más que a la ineficacia en su acción. Por ejemplo, si uno coloca un objeto dentro de un desinfectante líquido puede observar que sobre la superficie del objeto se forman pequeñas burbujas, el área bajo la burbuja está seca y los microorganismos en esa área no serán afectados por el desinfectante. Del mismo modo, si hay zonas con grasas, herrumbre o suciedad sobre la superficie a desinfectar los microorganismos bajo esa cubierta protectora no contactarán con el desinfectante, por eso es conveniente limpiar o raspar la superficie de los objetos a desinfectar para que el desinfectante actúe con eficacia.



## Propiedades de algunos desinfectantes comunes

a) Alcohol. Alcoholes etílico o isopropílico en una concentración de 70-85% son generalmente usados. Los alcoholes desnaturalizan las proteínas y tienen una acción germicida lenta; sin embargo, son desinfectantes efectivos contra virus que contienen lípidos.

b) Formaldehído. El formol para uso como desinfectante es generalmente comercializado a una concentración de 37% de gas en solución acuosa.

El formol a una concentración de 5% es un líquido desinfectante efectivo. Este desinfectante al 0.2 a 0.4% se usa para inactivar virus en la preparación de vacunas. El formol a temperaturas de refrigeración pierde su actividad desinfectante. Cuando se usan soluciones de formol en el laboratorio se deben tomar precauciones porque su olor picante y su acción irritante pueden lesionar las mucosas. Los vapores desprendidos de las soluciones de formol son desinfectantes muy efectivos para usarlos en ambientes determinados o edificios completos. Los gases de formol pueden ser generados por calentamiento del paraformaldehído (un compuesto polimerizado sólido) es decir, el calor despolimeriza al compuesto y a desprende gas.

c) Fenol. El fenol por sí, no es usado muy frecuentemente como desinfectante. El olor del producto no es agradable y los residuos pegajosos permanecen sobre las superficies tratadas, sobre todo cuando se esteriliza con vapor. Si bien el fenol no se usa corrientemente como desinfectante, sus homólogos y compuestos fenólicos, son elementos básicos de un buen número de desinfectantes.

Los compuestos fenólicos son efectivos como desinfectantes contra ciertos virus, rickettsias, hongos y bacterias vegetativas. No son efectivos sin embargo, contra esporas bacterianas.

d) Compuestos de amonio cuaternario. Después de 40 años de probar y usar los compuestos de amonio cuaternario, aún existen controversias sobre su uso como desinfectantes. Estos detergentes catiónicos son buenos y fuertes desinfectantes de superficies contaminadas. La presencia de sustancias proteínicas disminuye su efectividad por que se combina con ellas. Estos compuestos tienden a agrupar los microorganismos y neutralizarlos por los detergentes que contienen. Por tanto son bacteriostáticos, tuberculostáticos, esporostáticos, fungistáticos y algistáticos en bajas concentraciones. Actúan contra bacterias, hongos, algas y virus lipofílicos en concentraciones medianas, pero no actúan contra micobacterias, esporas o virus hidrofílicos aún en altas concentraciones. Tienen la ventaja de ser inodoros, no manchan y no son corrosivos para metales, son estables, no



son tóxicos y son baratos.

- e) Cloro. Este halógeno es un desinfectante universal activo contra todos los microorganismos, incluyendo las esporas bacterianas. El cloro se combina con las proteínas y rápidamente disminuye su concentración y efectividad. El cloro libre es un elemento muy activo. Es un fuerte agente oxidante y corrosivo de metales. Las soluciones de cloro son inestables por consiguiente se debe usar en soluciones recientemente preparadas. El hipoclorito de sodio, es un compuesto usado generalmente como desinfectante clorinado. Un excelente desinfectante clorado puede prepararse a base de los blanqueadores usados en lavanderías. Estos blanqueadores generalmente contienen 5.25% de cloro ó 52.500 ppm. Si se diluye 1 a 100 la solución tendrá 525 ppm. de cloro disponible y si se agrega un detergente en concentración de 0.7% se crea un buen desinfectante.
- f) Iodo. Las características del cloro y yodo son similares. Uno de los grupos de desinfectantes más populares usados en el laboratorio es el de los yodados.

La concentración recomendada por los fabricantes es de 1 onza en 5 galones de agua que es igual a 25 ppm de yodo disponible ó 3 onzas en 5 galones que da una concentración de 75 ppm, en esta concentración es porcentaje de yodo libre es igual a .0075%. Lo correcto es desinfectar superficies limpias o líquidos claros ya que, como en el caso del cloro, su efectividad disminuye si están presentes sustancias proteicas.

#### Limpieza y desinfección del Laboratorio.

El trabajo diario en un laboratorio, presupone accidentes dentro del área de trabajo que conlleva la contaminación de los ambientes y superficies de trabajo. Uno de los problemas más frecuentes es la contaminación por rotura del material contaminado, o derramamiento de cultivos en medios líquidos o sólidos, escape por medio de aerosoles, etc. Las medidas preventorias que deben tomarse en estos casos dependerán de la naturaleza del material infectante así como del ambiente o superficie contaminada.

Si el área contaminada es pequeña bastará con aplicar un desinfectante concentrado líquido, limpiar con un material absorbente como algodón, servilletas, etc., para luego ser desechados. Sin embargo, si estos accidentes ocurren en un ambiente amplio y la contaminación es considerable, por ejemplo en un cuarto cerrado se tomarán medidas más radicales tales como: Evitar inhalar aerosoles reteniendo la respiración y abandonando inmediatamente los ambientes. Si se sospecha que las prendas de vestir se contaminaron, cambiarse inmediatamente de ropa con el mayor cuidado posible cubriendo las partes contaminadas para luego someter toda la ropa a esterilización. Lavar todas las áreas potencialmente contaminadas así como brazos, cara y manos.



Si hay facilidades de ducharse hacerlo tan pronto como sea posible. No entrar al área contaminada antes de por lo menos 40 minutos después del accidente para permitir que los aerosoles disminuyan al mínimo. Usar una caja de primeros auxilios que incluya: pinzas, toallas de papel, esponjas, desinfectantes, respiradores y guantes de hule para iniciar el aseo y desinfección.

Para entrar al área contaminada e iniciar la limpieza y desinfección se deben usar prendas protectoras: guantes, máscaras, lentes protectores, overoles (no usar batas si va a desinfectar el piso) botas de hule. Luego use la caja con el material de desinfección, tome el desinfectante y con todo cuidado vierta sobre las áreas contaminadas. Evite salpicar o rociar el desinfectante. Permita actuar al desinfectante por 15 minutos, luego use toallas de papel u otro material absorbente (algodón o tela) para limpiar y secar el área. Coloque la toalla en un contenedor colocando en el fondo algodón empapado en desinfectante o jabón, este contenedor será posteriormente autoclavado. Sâquense las prendas protectoras, guantes, overoles, botas, máscaras, etc., para llevarlas al autoclave. Lávese bien las manos, cara y si es posible dúchese usando jabón desinfectante.

Si el accidente por derrame de material contaminado ocurre dentro de una cámara de seguridad biológica proceda de la siguiente manera: La desinfección química se iniciará mientras el sistema de ventilación de la cámara esta funcionando para evitar que los contaminantes escapen de la cámara. Lave las paredes de la cámara, superficie de trabajo y equipo con desinfectante. Un desinfectante con detergente tiene la ventaja que el detergente ayuda a remover la suciedad a la vez que desinfecta. Use guantes durante el proceso de desinfección. Retire la parrilla y las fuentes, para desinfectar cuidadosamente la superficie de la cabina. Los guantes, toallas, esponjas, etc., usadas para la desinfección serán posteriormente autoclavadas. Este procedimiento no desinfecta los filtros, conductos de aire, ventiladores u otras partes interiores de la cabina; para estas partes use el gas de formol para lo cual tome polvo de formaldehido calculando el volumen de la cabina y coloque en una fuente 0.3 g. de paraformaldehido por cada pié cúbico de la cabina ponga la fuente con el desinfectante en una fuente de calor a 450 grados F. y selle la cabina. Si el aire de la cabina sale al ambiente del laboratorio conecte la abertura a una manguera que la hará salir por una ventana. Luego de la desinfección (por despolimerización del paraformaldehido) apague la fuente de calor y deje la cabina cerrada por 1 hora. Abra la cabina, ventílela por varias horas para eliminar el exceso de formol y luego haga una limpieza prolija de todas sus partes.



## CONTROL DE RIESGOS DURANTE EL MANEJO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

El mantenimiento de una o más colonias de animales de laboratorio así como el manejo de estos animales usados como modelos experimentales suponen riesgos de contaminación por cuanto estos animales padecen enfermedades o pueden ser portadores de agentes infecciosos que afectan al hombre por un lado y por otro cuando se usan en experimentos para identificar algún patógeno tales como bacilo tuberculoso, brucela, leptospiras, virus rábico, etc., sus excretas, heridas o lesiones pueden ser fuentes de contaminación para quien los manipula. No se debe olvidar que a pesar de todos los adelantos de la tecnología moderna, sobre todo cuando se trabaja con animales convencionales el operador de laboratorio está constantemente expuesto a riesgos de contaminación. Además en la actualidad se está generalizando cada vez más el uso de animales silvestres, como modelos experimentales o como medios de producción de biológicos como por ejemplo vacunas; pues bien muchos de estos animales pueden ser portadores de agentes infecciosos que en ellos no producen signo alguno de enfermedad, pero si son altamente patógenos para el hombre. Solamente basta recordar el brote de la llamada Enfermedad de Marburgo o Enfermedad de los Monos Verdes, ocurrida en la Ciudad de Marburgo y que costó la vida a varios médicos y enfermeras por manipular visceras de monos verdes capturados en Africa. En este caso se demostró que la enfermedad era producida por un virus portado por el primate no humano al cual no le producirá ninguna alteración de su salud.

Abundando más sobre estos peligros, los animales de laboratorio aparentemente normales pueden portar agentes patógenos para el hombre. Sólo para citar unos cuantos ejemplos, el ratón es portador del virus de la coriomeningitis linfocítica, los roedores pueden ser portadores de leptospiras, pasteurelas, estafilococos, estreptococos, etc.; todos estos agentes, patógenos para el hombre.

Por todas estas consideraciones es necesario tomar toda clase de precauciones para evitar accidentes cuando se trabaja con animales de laboratorio.

En síntesis se señalan algunas prácticas aconsejables.

1. En lo posible disponer albergues adecuados tanto para la cría de animales como para aquellos usados en experimentación.
2. No mantener animales de laboratorio dentro de los ambientes de trabajo de rutina.
3. Utilizar métodos adecuados de sujeción de los animales de acuerdo a la especie con que se trabaja.
4. Si se inoculan animales con agentes infecciosos altamente



patógenos, utilizar medios de alta seguridad biológica.

5. Vigilar constantemente a los animales inoculados observando los signos que estos presentan.
7. Esterilizar las cajas de animales fuera de uso e incinerar las camas, y restos de alimento.
8. Esterilizar diariamente las excretas de los animales inoculados.
9. Siempre que se entre o salga de un local destinado a animales habrá que cambiarse de zapatos y ropa exterior. Si es necesario se usará ropa y guantes de protección adecuados.
10. Debe impedirse la entrada de insectos, roedores silvestres, u otros animales a los ambientes de los animales de laboratorio.
11. Si un animal de experimentación se escapa de su jaula lo mejor será sacrificarlo e incinerarlo en vez de devolverlo a su recinto.
12. Las inoculaciones y exámenes de necropsia en los que hay exposición a agentes patógenos peligrosos deben realizarse en cámaras de bioseguridad.
13. Tener presente que los animales de laboratorio pueden ser portadores asintomáticos de microorganismos sumamente peligrosos para el hombre.
14. Todo personal que trabaja con animales de laboratorio estará inmunizando contra el tétanos, rabia y otras enfermedades según el caso.
15. Después de manipular los animales de laboratorio uno debe lavarse las manos con sumo cuidado.
16. Si se produjeran heridas, por leves que estas sean, mientras se manipulen animales de experimentación, se les debe de tratar de inmediato, estimulando primero la hemorragia y luego lavarla con abundante jabón y agua, para luego continuar con el tratamiento.



## MANIPULACION, TRANSPORTE Y ENVIO DE MUESTRAS

Tanto la manipulación, el transporte y recepción de muestras y agentes infecciosos mal embalados presupone riesgos de infección para todas las personas involucradas en cualquiera de las fases del proceso. La manipulación incorrecta dentro del laboratorio no sólo pone en peligro al personal inmediato sino también al personal administrativo o de secretaría. El transporte de material infeccioso entre laboratorios e instituciones extiende el ámbito de riesgo al público y al personal encargado del transporte.

El envío de sustancias infecciosas y de muestras con fines de diagnóstico constituye motivo de preocupación para todos los que intervienen en este proceso, desde el investigador, hasta el personal de laboratorio e incluso los empleados de transporte. Por una parte los investigadores y personal de laboratorio se preocupan por los medios de transporte de las muestras; pues del tiempo que media entre el envío y la recepción depende el diagnóstico adecuado. Pero de otro lado al personal encargado del transporte le inquieta la posibilidad de contraer infecciones causadas por la salida de agentes infecciosos de recipientes rotos o mal cerrados.

Aunque en la bibliografía no se citan casos de enfermedades atribuibles a accidentes de transporte, se han promulgado prescripciones de seguridad a menudo contradictorias. Por supuesto, se prohíbe el envío de sustancias infecciosas sin identificar o sin marcar. Esta práctica de no indicar el peligro, entraña riesgos para el personal de transporte y más aún para el personal de laboratorio que las recibe donde es posible que los encargados de abrir el paquete sean administrativos o secretarías sin adiestramiento y sin la información debida. El riesgo se ve agravado por el embalaje defectuoso ya que un recipiente roto puede dar lugar a la contaminación del personal, y del laboratorio.

En los reglamentos de compañías y consorcios internacionales como IATA por ejemplo se clasifica como mercancías peligrosas a los agentes infecciosos y se exige que todos los paquetes enviados por flete aéreo o correo aéreo internacional vayan acompañados de un formulario de la IATA de declaración de mercancías peligrosas. Estas disposiciones lamentablemente no se cumplen en el interior de nuestros países.

### Normas de Embalaje.

Los embalajes destinados a las sustancias infecciosas y las muestras de diagnóstico constan de tres cajas: a) un recipiente primario en el que se coloca la muestra; b) un recipiente intermedio que contiene material absorbente entre él y el recipiente primario, en cantidad suficiente para absorber todo el líquido de la muestra en caso de fuga; c) una envoltura exterior para proteger al recipiente intermedio de las influencias exteriores durante el transporte. Por fuera de la envoltura bien



adherido se debe colocar el protocolo (una copia de este se enviará por correo) así como cualquier otra información, de tal manera que quien recibe la encomienda identifique los riesgos a los que puede estar expuesto.

### **Accidentes de Transporte**

Si un paquete que contiene sustancias infecciosas se deteriora durante el transporte o si se piensa que deja escapar el contenido o tiene algún otro defecto el transportista deberá ponerse en comunicación con el expedidor y con el destinatario, así como con los servicios de salud pública. Al mismo tiempo habrá que restablecer provisionalmente la seguridad del paquete, para lo cual se recomienda:

- a) Cubrirse las manos con bolsas de plástico a manera de guante.
- b) Con las manos cubiertas tomar el paquete y colocarlo dentro de una bolsa de plástico adecuada.
- c) Introducir las bolsas que sirvieron como guantes.
- d) Cerrar la bolsa y colocarla en lugar seguro.
- e) Desinfectar la zona contaminada en caso de escape o derramamiento del material.
- f) Asearse las manos con bastante jabón y agua.

Las medidas que han de tomar los servicios de salud pública y/o de veterinaria para evitar la propagación de la infección, desinfectar, aislar los casos, administrar vacunas, inmunoglobulinas, etc., y advertir a los servicios de otras zonas, donde puede haberse manipulado el material infeccioso, son esencialmente las mismas que se requieren luego de un accidente de laboratorio y han de estar previstas en los planes de emergencia.



## PROCEDIMIENTOS DE EMERGENCIA

El Director o Jefe de Laboratorio con la colaboración del personal y del Inspector de Seguridad debe redactar el Plan de Emergencia. Este procedimiento tiene la ventaja que el propio personal que conoce los riesgos a los cuales está expuesto establecerá las reglas de juego en casos de emergencia. El plan de emergencia debe ser colocado en lugar visible dentro del laboratorio de manera de poder consultarlo cuando sea necesario.

Los planes de emergencia deben preveer lo siguiente:

- a) Roturas y derrames.
- b) Inyecciones accidentales, cortes y abrasiones.
- c) Ingestión accidental de sustancias potencialmente peligrosas.
- d) Formación de aerosoles potencialmente peligrosos.
- e) Rotura de tubos en centrifugas que no tengan cubetas de seguridad.
- f) Incendios, inundaciones y desastres naturales.
- g) Actos de vandalismo.
- h) Servicios de emergencia: A quien dirigirse.
- i) Equipo de emergencia y su ubicación.



## NORMAS DE BIOSEGURIDAD

- Crearse la comisión de Bioseguridad del Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario, de la Dirección General de Servicios Pecuarios.
- La comisión a la que se refiere el artículo anterior estará constituida por: 4 profesionales y 2 administradores.
  - Uno de los miembros será elegido Inspector de Bioseguridad.
- Son funciones de la comisión de bioseguridad:
  - a) Velar por el estricto cumplimiento de las normas consignadas en el presente reglamento.
  - b) Gestionar ante quien corresponda la implementación de los equipos y materiales de seguridad necesarios para prevenir los accidentes de personal, así como los daños que puedan sufrir las instalaciones y equipos en caso de desastre.
  - c) Poner en conocimiento de las autoridades las infracciones en que incurra cualquier miembro del personal y proponer las sanciones respectivas en casos de que las infecciones fueran intencionales o premeditadas.
  - d) Adiestrar al personal respecto a las normas de bioseguridad que deben observar en el laboratorio así como en las medidas de prevención, protección, salvamento, etc., en casos de accidentes.
  - e) Otras que le sean asignadas.
- El Laboratorio Central de diagnóstico veterinario, debido al material infeccioso con el que trabaja: *Brucella* sp., *Mycobacterium* sp., rabia, etc., está clasificado como laboratorio de contención, en concordancia con la clasificación internacional que toma en cuenta el tipo de riesgo a que está expuesto el personal.
- Las áreas de trabajo del laboratorio son zonas de seguridad biológica, por tanto no podrán entrar en ellas personas ajenas al personal de planta.
- Cuando se autorice la entrada de personas ajenas al laboratorio, estas deben ser informadas de los riesgos a que están expuestas y se les exigirá cumplan con los requisitos mínimos (inmunizaciones) para entrar en áreas de circulación restringida.
- Queda terminantemente prohibido al personal, comer, beber, fumar, aplicar cosméticos en las zonas de trabajo, así mismo



guardar alimentos en los aparatos (refrigeradores, estufas, etc.) localizados en los laboratorios.

- No es permitido pipetear con la boca, siendo obligatorio por lo tanto el uso de porta pipetas.
- En todo momento el laboratorio debe mantenerse limpio y aseado, retirando del mismo todo material que no tenga relación con el trabajo.
- Las superficies de trabajo se descontaminarán por lo menos una vez por día y en toda ocasión que se contamine con material infeccioso.
- La descontaminación la realizarán los auxiliares de laboratorio quienes conocen los riesgos de contaminación. Queda prohibida la tarea de descontaminación por parte del personal de limpieza.
- El personal que haya manipulado material infeccioso y/o animales inoculados están obligados a lavarse y desinfectarse las manos, así mismo, al abandonar el laboratorio.
- El personal del laboratorio está obligado al uso de bata o uniforme mientras permanece en el área de trabajo, no se podrá sacar del laboratorio la ropa de trabajo, sin antes desinfectar las prendas por los procedimientos convenidos.
- Siempre que el trabajo, requiera proteger los ojos y cara de salpicaduras o impactos, es obligatorio el uso de gafas de seguridad, viseras, máscaras faciales u otros dispositivos de protección.
- Los procedimientos técnicos se practicarán de manera que se evite en lo posible la formación de aerosoles.
- Los líquidos o sólidos contaminados, obligatoriamente serán descontaminados antes de ser eliminados o de volver a utilizarlos. Los materiales contaminados que se vayan a esterilizar en autoclave o incinerar fuera del laboratorio deben obligatoriamente introducirse en recipientes resistentes e impermeables, que se cerrarán antes de sacarlos del laboratorio.
- El comité de bioseguridad está obligado a establecer un programa de lucha contra insectos y roedores y el Inspector de bioseguridad a supervisar su estricto cumplimiento.
- Está terminantemente prohibido mantener animales inoculados dentro de los laboratorios; estos se alojarán en ambientes especialmente destinados para este fin. Así mismo queda prohibida la entrada en el laboratorio de animales que no tengan relación con los trabajos que se estén utilizando.



- El empleo de jeringas y agujas hipodérmicas solo está permitido para la inyección parenteral y la aspiración de líquidos de los animales de laboratorio y de los viales de biológicos con cápsula perforable. Para manipular líquidos infecciosos no se usarán jeringas y agujas hipodérmicas; en su lugar pipetas automáticas.
- En toda tarea que implique contacto con material infeccioso, animales inoculados, etc. es obligatorio usar guantes desechables, los mismos que una vez terminado el trabajo se sacarán cuidando de no contaminarse las manos, se esterilizarán en autoclave junto con los desechos del material manipulado antes de enviarlos a la basura. Si no se dispone de guantes desechables se trabajará con guantes estériles, los cuales serán esterilizados una vez terminada la tarea.
- Si se producen accidentes en el laboratorio tales como pinchazos, cortes, derramamientos de material infecciosos, etc., es obligatorio poner en conocimiento del Inspector de Bioseguridad y Jefe de Laboratorio a fin de que se tomen las medidas necesarias para la prevención y/o tratamientos que correspondan.
- Es obligatorio llevar un libro de registro de accidentes de laboratorio para evaluar la magnitud del evento, efectuar la vigilancia respectiva y determinar por consiguiente las medidas precautorias. EL libro de registro lo llevará el Inspector de Bioseguridad o quien haga sus veces.
- De todos los miembros del personal del laboratorio y personas expuestas se tomarán muestras de suero sanguíneo, los que se mantendrán como referencia y cada cierto tiempo (períodos de 6 meses o 1 año por ejemplo) se volverán a tomar nuevas muestras.
- En lo posible se establecerá el trabajo en pareja, por tanto se evitará que una persona trabaje sola en el laboratorio.
- En las puertas del laboratorio que ofrezcan peligro de contaminación se fijarán carteles en los que se identifique el agente infeccioso así como el nombre del Jefe de Laboratorio o de la/s persona/s responsables del área y se indique también la condición impuesta a quienes entren en la zona (inmunización).
- Es obligatorio que en el laboratorio se lleve ropa apropiada encima de la ropa de calle (batas, mandiles, delantales, etc.). La ropa del laboratorio no debe lucirse fuera de él y debe descontaminarse antes de enviarla al lavado.
- En los recintos de animales inoculados es obligatorio el uso de equipo de protección respiratoria.
- Son indispensables los medios de seguridad tales como



extinguidores de incendios, protección contra accidentes eléctricos, instalación de duchas para casos de urgencia y medios para lavarse los ojos.

- En el laboratorio existirá una sala de primeros auxilios, fácilmente accesible y convenientemente equipada.
- Para evitar contaminaciones la evacuación de desechos se realizarán luego de:

Esterilización en autoclave para los desechos sólidos.

Tratamiento de las aguas usadas en el Laboratorio.

Incineración de cadáveres y sólidos no peligrosos en incineradores con dispositivos de post-combustión y eliminación de humos.

#### **MATERIAL DE LABORATORIO**

- El material de laboratorio debe ser seguro y reunir los siguientes principios generales:
  - a) Permitir limitar o evitar los contactos entre el operador y el agente infeccioso.
  - b) Estar construido con materiales impermeables a los líquidos, resistente a la corrosión y acordes con las normas de resistencia estructural.
  - c) No presentar puntas demasiado agudas o bordes cortantes.
  - d) Estar diseñado, construido e instalado con miras a simplificar su manejo y conservación, así como facilitar la descontaminación y las pruebas de certificación.

#### **MATERIAL DE BIOSEGURIDAD QUE DEBE UTILIZARSE**

- Para evitar accidentes por contaminación es obligatorio usar:
  - 1) Dispositivos manuales de pipeteo, para no utilizar la boca.
  - 2) Cámaras de seguridad biológica de los tipos I, II y III según el caso.
  - 3) Microincineradores de asa para reducir la formación de aerosoles.
  - 4) Frascos y tubos con tapón de rosca, para lograr una contención positiva de las muestras.
  - 5) Autoclaves para esterilizar el material contaminado.

#### **VIGILANCIA MEDICA Y SANITARIA**

- Los objetivos de la vigilancia médica y sanitaria del personal de laboratorio son:
  - a) Disponer de un medio de prevenir las enfermedades



profesionales mediante la exclusión de los individuos muy susceptibles y el reconocimiento periódico del personal contratado.

- b) Disponer de un medio precoz de detección de las infecciones adquiridas en el laboratorio.
- c) Evaluar la eficacia del material y de los procedimientos de protección.

- El Jefe del Sistema de Laboratorios de Diagnóstico tiene la obligación de mantener en forma permanente bajo vigilancia médica al personal que trabaja en dicho sistema.
- Los trabajadores de laboratorio que manipulan micro-organismos del grupo de riesgo I, deberán someterse a un reconocimiento médico previo a su ingreso al laboratorio; se les instruirá sobre la necesidad de observar las reglas de bioseguridad y comunicarán inmediatamente a sus superiores en caso de enfermedades o accidentes de laboratorio.
- El personal que manipule micro-organismos del grupo de riesgo II, además del reconocimiento médico previo se les practicará un examen físico y se les tomará una muestra de suero sanguíneo para utilizarla como referencia. El laboratorio mantendrá al día la lista de médicos de cabecera de los empleados; así mismo es obligatorio mantener un registro de enfermedades y ausencias laborales y sus causas. Por último, en caso de mujeres en edad fértil deben ser informadas en forma clara los riesgos a que está expuesto el feto a ciertos agentes infecciosos tales como toxoplasmosis, citomegalovirus, etc.
- El Jefe del Sistema de Laboratorio de Diagnóstico Veterinario y el Comité de Bioseguridad tienen la responsabilidad del adiestramiento paramédico y permanente de todo el personal, sobre las medidas y medios de bioseguridad para evitar los accidentes debido a la manipulación de material infeccioso o mal uso del equipo de laboratorio y bioseguridad respectivamente.
- El comité de bioseguridad vigilará permanentemente que los jefes de departamento y/o sección, señalen al personal de apoyo los peligros que entrañan la formación de aerosoles; siembra en agar, pipeteo, centrifugación, apertura de recipientes con medio de cultivo, manipulación de muestras, manejo de jeringas, manejo inadecuado de animales de laboratorio y eliminación de material infeccioso.

#### **MANIPULACION, TRANSPORTE Y ENVIO DE MUESTRAS**

- Los recipientes para enviar muestras deberán de ser impermeables. Una vez tapados no debe quedar ningún material en el exterior.



- Para evitar las fugas accidentales o el derramamiento en el medio ambiente se utilizarán recipientes secundarios especiales para el transporte de las muestras entre laboratorios regionales y central o entre departamentos. Estos recipientes podrán ser metálicos o plásticos.
- Para la recepción de muestras se proveerá un local de recepción independiente y aislado del resto de los ambientes de trabajo.
- En lo posible, toda encomienda que llegue al laboratorio será abierta en una cámara de seguridad para evitar accidentes.



## ESTERILIZACION Y DESINFECCION

### Esterilización

Este término se emplea para describir a una serie de procesos físico y/o químicos que propician esterilidad, entendiendo por esterilidad desde el punto de vista microbiológico, al estado que guarda un producto, material o implemento, al quedar totalmente libre de microorganismos vivos. En biología se define a la esterilidad como la incapacidad permanente de procrear, por lo que a los procesos que causan dicha incapacidad reproductiva se les llama también mecanismos de esterilización.

### Desinfección

Esta palabra se usa para indicar la acción de restar a los microorganismos su potencial infeccioso, de esta manera se reduce la posibilidad de que ocurra una infección. A diferencia con la esterilidad, en el caso de la desinfección puede haber microorganismos vivos en el área en que se produce la acción de desinfectar, pero estos se encuentran limitados en su capacidad de causar una infección.

### Antisepsia

Etimológicamente este término significa contra-putrefacción (anti-contra, sepsis-putrefacción), sin embargo, es una palabra comúnmente usada para señalar la acción de eliminar microorganismos capaces de causar infección. Aunque este término se usa frecuentemente como sinonimia de desinfección, ambos suelen diferenciarse en que la desinfección se aplica fundamentalmente a objetos inanimados, mientras que la antisepsia se emplea generalmente en tejidos vivos.

Se considera importante definir también otros términos como lo son:

### Asepsia

Ausencia de microorganismos vivos en un órgano o tejido.

### Germicida

Con este nombre se definen los compuestos capaces de causar la muerte de gérmenes, pudiendo ser sustituido por las palabras: viricida, bactericida o fungicida, cuando se refiere específicamente a compuestos que causan la muerte de virus, bacterias y hongos, respectivamente.

### Bacteriostático y Fungistático

Son términos usados para referirse a compuestos que inhiben



el metabolismo de bacterias y hongos, respectivamente, evitando el crecimiento y proliferación de los mismos.



## MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN

Como ya se mencionó previamente, la esterilización es la acción que se efectúa mediante procedimientos físicos y/o químicos, con el fin de eliminar microorganismos vivos en diferentes sustancias, compuestos, instrumentos, alimentos, etc. A continuación se describen los diferentes procedimientos empleados rutinariamente para lograr la esterilización:

### Esterilización mediante principios físicos

#### Temperatura:

Sabemos bien que las diferentes temperaturas influyen directamente sobre el metabolismo celular y sobre su capacidad de sobrevivir o morir. Por ejemplo, las bacterias mesofílicas se desarrollan libremente a temperaturas de aproximadamente 37 grados C. mientras que su crecimiento se inhibe a 4-10 grados C., temperatura que propicia el desarrollo de bacterias psicofílicas. Por otra parte, las bacterias termofílicas sobreviven a temperaturas de 80 grados C. y superiores, mientras que los gérmenes psicofílicos y mesofílicos mueren a estas temperaturas. Con excepción de las bacterias esporuladas. La muerte de microorganismos mediante el calentamiento a temperaturas superiores a 80 grados C. se debe a que las proteínas sometidas a estas temperaturas se desnaturalizan al romperse los enlaces de hidrógeno y de azufre, en sus estructuras secundarias y terciarias. Este fenómeno hace que las fibras separadas se hagan menos solubles y los líquidos se tornen más viscosos y turbios, culminando en un proceso de coagulación. Bajo estas circunstancias se pierden las actividades funcionales de dichas proteínas, como lo es su propiedad enzimática. La aplicación de calor representa uno de los mecanismos más importantes para producir esterilidad. Se consideran dos formas comunes de empleo del calor: calor húmedo y calor seco.

**Seco:**

- a: Desnaturalización de proteínas
- b: Daño oxidativo
- c: Efecto tóxico por la alta concentración de electrolitos.

**Húmedo:**

- a: Desnaturalización de proteínas.
- b: Coagulación de proteínas, éste se considera el principal mecanismo, pero existen otros de daño celular menos aparente que suceden antes de la coagulación.
  - Daño en la membrana celular afectando el paso de solutos al interior y la salida de éstos.
  - Daño en la respiración, el mecanismo residen en la membrana.
  - Daño en el inicio de la síntesis de proteínas.



- Salida de aminoácidos y de iones de K+.
- Autodegradación de ácidos nucleicos.

#### Calor Húmedo:

- a. La ebullición: es el ejemplo más representativo de este método de esterilización. Durante siglos se ha considerado importante la ebullición para reducir los peligros de adquirir enfermedades mediante la ingestión de agua y alimentos posiblemente contaminados. En la práctica se recurre con frecuencia a la ebullición para esterilizar jeringas, agujas, frascos y otros instrumentos, cuando no se cuenta con autoclave.
  
- b. Autoclave: La aplicación de calor húmedo, combinado con otros factores como lo son la presión y el tiempo, han originado uno de los equipos más efectivos para la esterilización, el autoclave. Este consiste en un aparato de metal conteniendo una doble cámara; en la cámara interna se colocan los materiales que serán esterilizados. El aparato cierra herméticamente, teniendo manómetros y válvulas que permiten controlar la presión. Para su funcionamiento se somete el autoclave a una fuente de calor que causa la ebullición del agua de la cámara externa o de la fuente de vapor.

Al aumentar la cantidad de vapor, éste pasa a la cámara externa y de ahí a la interna, la que aumenta la presión, simultáneamente al incremento de temperatura. A mayor presión de vapor, mayor temperatura. Se ha demostrado plenamente que al alcanzar una presión de 15 libras, se obtiene una temperatura 121 grados C., lo cual se conoce como las constantes para esterilización mediante autoclave, durante 15 minutos. Es importante que al inicio de la ebullición se abra la válvula para que se permita la libre salida del aire; la válvula se cierra al momento en que empieza a salir vapor. Se sabe que el aire no tiene capacidad de esterilización, aún cuando se encuentre comprimido, mientras que el vapor comprimido propicia la hidratación y por ende la desnaturalización y/o coagulación de proteínas. En el Cuadro 1, se presenta el efecto de la combinación calor-húmedad sobre la albúmina de huevo.

- c. Tratamiento con vapor: En ocasiones se emplea el tratamiento con vapor sin asociarlo a la presión, alcanzando así temperaturas inferiores a los 100 grados C. Este procedimiento se emplea con productos delicados que podrían alterarse a mayores temperaturas. Es importante en procesos de esterilización fraccionada o conocida como Tindalización. Este método fue desarrollado por Tindall y consiste en someter los materiales que deben esterilizarse, a un tratamiento con vapor mediante una ebullición de 100 grados C. durante escasos minutos, repitiendo la operación en 3 ó 4 ocasiones, separadas durante 24 horas. Este intervalo permite a las esporas germinar a su fase vegetativa, que son fácilmente destruidas a 100 grados C.



d. **Pasteurización.** Este procedimiento se emplea fundamentalmente para eliminar gérmenes patógenos que pudieran estar presentes en leche destinada al consumo de humano. Este método no esteriliza a la leche. Consiste en aumentar la temperatura a 63 grados C. durante 30 minutos e inmediatamente refrigerarla a 4 grados C. (pasteurización lenta); o bien subir súbitamente la temperatura a 71.6 - 80 grados C. durante 15 segundos y rápidamente refrigerarla (pasteurización rápida). Algunos saprófitos logran sobrevivir a estos métodos de pasteurización, causando la descomposición de la leche en caso de que ésta no sea refrigerada adecuadamente. En los últimos años se ha venido empleando un proceso llamado ultrapasteurización, consistente en subir la temperatura a 100 grados C. durante fracciones de segundo, procediéndose a la inmediata refrigeración. Este método si elimina a todos los microorganismos presentes en la leche.

Cuadro 1.1

CONTENIDO DE AGUA %	TEMPERATURA APROXIMADA DE COAGULACION EN GRADOS C.
50	56
25	76
15	96*
5	149**
0	165**

\* Agua hirviendo a 100 grados C.

\*\* Temperatura de un horno bacteriológico a 145 y 165 grados C.  
1. Tomado del Frobisher, et. al., Fundamentals of Microbiology. 1974, Pag. 291.

### Calor Seco

a. **Esterilización en horno:** Los primeros indicios sobre esterilización en calor seco en horno corresponden a Koch y Wolffhiigel, en 1881. Como podemos observar en el Cuadro 1, la desnaturalización y coagulación de proteínas en ausencia de humedad, requieren de temperaturas muy elevadas. Así por ejemplo, tenemos que bacterias en su forma vegetativa son muertas a temperaturas de 100 grados C. en una y media horas. Las formas esporuladas deberán permanecer 3 horas a 140 grados C., si se aumenta la temperatura a 160 grados C. el tiempo baja a una hora; ahora bien, si aumentamos a 400 grados C. el tiempo se reducirá hasta 30 segundos.



Este tipo de esterilización es usado principalmente en el laboratorio para el material de cristalería como son cajas de petri, matraces, botellas e instrumentos de metal. El aparato usado para este método de esterilización se le llama horno y es muy parecido a los hornos domésticos.

- b. Flama: Otra forma de esterilización por calor seco es el flameado y esto en bacteriología se usa principalmente para las asas de inoculación, las cuales se calientan al rojo blanco. Lo mismo se hace con espátulas que se aplican a la superficie de tejidos que se someten a estudios bacteriológicos.
- c. Incineración: Es el método empleado para la destrucción de materiales contaminados, especialmente cadáveres y tejidos.

#### Frio:

Congelación: Cuando una suspensión de bacterias es congelada la cristalización del agua propicia la formación de pequeños reservorios de soluciones conteniendo sales, las cuales no son cristalizadas hasta que llegan a su punto eutótico, ejemplo: -20 grados C. para el NaCl. Una vez alcanzado este punto se satura la solución y la sal se cristaliza; las altas concentraciones de sales y posiblemente los cristales de hielo, dañan a la bacteria, así como el incremento de la sensibilidad a la lisozima. Sólo una parte de las células bacterianas mueren, pero repitiendo la congelación y descongelaciones de un cultivo se puede acabar con todo el contenido bacteriano vivo.

Este método es de uso común en la fabricación de antígenos en los cuales es importante que no se alteren los determinantes antigénicos.

#### Radiaciones

En radiobiología se consideran dos tipos de radiaciones, radiaciones de onda larga y radiaciones de onda corta. Ambos tipos poseen la capacidad de matar células, lo cual ha sido usado tanto con fines de desinfección como con objetivos terapéuticos en casos de cáncer.

- a. Radiaciones de Ondas Largas: Se refieren a rayos con una longitud de onda de 200 a 295 nm, por lo que son ondas no comprendidas en el espectro visible. Las radiaciones ultravioletas son representativas de este grupo. Los rayos ultravioleta no poseen capacidad ionizante pero son capaces de penetrar al interior de las células expuestas a ellos, causando fenómenos de excitación o activación, los que influyen directamente sobre los procesos de replicación del DNA, lo que puede llegar a ser fatal en las células en cuestión. Se usa para desinfectar locales y cámaras de seguridad.



Su efecto, dependiendo del tiempo y longitud de onda puede ser letal o mutágeno, el efecto bactericida se encuentra en el rango de 240 a 280 nm (260nm el óptimo).

El daño sobre el DNA es que forma puentes de enlaces covalentes entre pirimidinas con la formación de ciclo butano que son dímeros de timidina, cambian la forma del DNA, no hay apareamiento de bases por lo tanto no hay síntesis de DNA.

La luz ultravioleta se produce por lámparas de vapor de mercurio, una lámpara UV de 15 W produce  $38\text{MW}/\text{cm}^2/\text{Seg}$  a 1 m, es igualmente efectiva contra gram positivas y gram negativas la dosis letal para no esporulados es de  $1800\text{MW}/\text{cm}^2$  a  $6500\text{MW}/\text{cm}^2$  y en esporulados en 10 veces la dosis. No es muy confiable por variaciones en la emisión de rayos, variaciones en el medio ambiente, no penetra sólidos y poco a los líquidos.

- b. Radiaciones de Onda Corta: En este grupo se encuentran los rayos X y rayos gama (0.6-100nm y de 0.1 a 14 nm., respectivamente). Ambos poseen alta energía y amplio poder de penetración, además de ser capaces de producir ionización. Este proceso causa la formación y ruptura de enlaces de hidrógeno en el DNA, con la alteración de estructuras moleculares secundarias. La exposición prolongada a los rayos X no se usa en forma rutinaria por ser caro y peligroso.

### Mecanismo

En el paso de las radiaciones ionizantes a través de la materia, la energía de los protones es transferida por choque de un electrón en el átomo de la materia bombardeada. Después de este choque, un electrón es disparado del átomo con alta energía y velocidad, este electrón se va a salir de su órbita y chocar con nuevos átomos a los cuales ionizará y la energía producida va a ser disipada por todo el medio.

El efecto de las radiaciones ionizantes en organismos vivos depende de la cantidad de energía absorbida por éstos.

La energía para rayos X y  $\gamma$  es medida en roentgens que es aproximadamente equivalente a  $83\text{ erg/g}$  de aire.

La cantidad que es absorbida por el material viviente es en sí la dosis absorbida siendo ésta la dosis efectiva conociéndose como red, la cual se basa en energía absorbida de  $100\text{ erg/g}$  de aire. Existe otra unidad, la cual es  $\text{Mrad} = 10^6\text{ rad}$ , éste es la unidad usada para esterilización.

Los efectos de las radiaciones ionizantes, se dividen en dos:

- a. Efecto directo sobre las moléculas y está dado por la

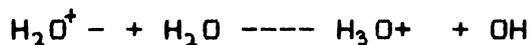


transferencia de energía a estas macromoléculas, pero éste no es muy importante.

- b. Debido a que toda materia viva tiene gran cantidad de H<sub>2</sub>O, el efecto indirecto de las radiaciones ionizantes es el más importante. Este consiste en que las radiaciones van a ionizar el agua.



El ión positivo va a reaccionar con H<sub>2</sub>O no ionizada, donde otra molécula de H<sub>2</sub>O cargada y un radical hidróxido libre.



La reacción puede ser también que el electrón reacciones con H<sub>2</sub>O, dando OH y H<sup>+</sup> libre.

El OH es un fuerte oxidante y el H<sup>+</sup> es un fuerte agente reductor. El radical OH es altamente reactivo con las macromoléculas, específicamente DNA rompiendo las ligaduras entre las dos cadenas.

La presencia de O<sub>2</sub> en las células al momento de la radiación aumenta el efecto de la radiación por producción de una cadena de reacciones auto-oxidativas además de la producción de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos.

Algunos compuestos químicos de la materia viva como grupos sulfhidrilo tienen un papel protector ante radiaciones ionizantes por el desviamiento de la energía absorbida.

La gran fuerza de penetración de las radiaciones ionizantes es lo que les da su efectividad como agentes esterilizadores.

A pesar de la gran energía intrínseca de los rayos catódicos, los rayos X y γ tienen mayor penetrabilidad.

Debido a esto la superficie de materia viva no queda esteril. Los rayos su efecto poco por debajo de la superficie y los rayos catódicos más profunda.

Con relación al efecto de las radiaciones sobre las bacterias tenemos.

- Efectivo para la mayoría de las bacterias no esporuladas.
- Esporuladas son las bacterias más resistentes a radiaciones ionizantes.
- Grampositivas más resistentes que gramnegativas (pseudomonas más sensibles).
- La intensidad de la radiación es poco importante con respecto a la dosis total administrada.
- El efecto letal de la dosis de radiaciones es exponencial con respecto a porcentaje durante todo el proceso, sin embargo, al final es importante en sobrevivencia de



organismos, por lo que la aplicación de la dosis completa es requerida. La dosis depende del número de microorganismos existentes en el medio, sin embargo, la dosis recomendada para la esterilización es de 2.5 Mrad., dando un amplio margen de seguridad.

Sus aplicaciones han sido en medicina y productos farmacéuticos, suturas, material de plástico, etc.

#### ULTRASONIDO:

El uso de ondas sonoras por arriba del rango audible (ultrasonido) es de gran utilidad en la destrucción de células (20 a 1000 kilociclos).

Los aparatos de ultrasonido para la fracción de células tienen un rango de 9 a 100 kilociclos por segundo.

#### Mecanismo

Las ondas sonoras a su paso por medios líquidos va a proporcionar cambio a presiones internas muy considerables, esto es por medio de la formación de espacios dentro de los líquidos; estos espacios son de aproximadamente 10 micrometros de diámetro, los cuales aumentan de tamaño hasta que se colapsan violentamente con la producción de presiones del orden de 1000 atmósferas, lo cual desintegra a las células; además del efecto por presión la sonicación produce cambios físico-químicos en el medio como la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuando O<sub>2</sub> está presente. También despolarización de macromoléculas ruptura de la doble cadena de DNA.

Los más susceptibles son los bacilos grampositivos; más resistentes estafilococos. En largos períodos siempre hay sobrevivientes por lo que no es efectivo.

#### FUERZA MECANICA

- Ruptura por presión: En numerosas ocasiones las células son fácilmente fragmentadas por medio de la agitación en presencia de partículas sólidas como lo son las perlas de vidrio o de acero. La agitación violenta de bacterias bajo estas condiciones permite la ruptura de las mismas con la consecuente liberación de antígenos citoplásmicos.

#### FILTRACION

El uso de filtros para la esterilización es de gran importancia en bacteriología ya que existen varias soluciones que no pueden ser esterilizadas por calor, sin que sufran una importante alteración en sus propiedades físicoquímicas.

Existen gran variedad de filtros, los cuales se describen a continuación:



- Filtro Seitz o Filtro de Asbesto:  
Este consta de asbesto prensado en discos de poco espesor el cual es colocado en una rejilla de metal, sujeta por tres abrazaderas de rosca. El líquido a filtrar se aloja en la vasija de la parte superior del filtro y por medio de presión de vacío se pasa a través del filtro, el cual detienen bacterias y a las partículas.
- Filtro de Berkefield o de Tierra de Diatomeas:  
Esta es un fino polvo silíceo generalmente blanco. Los filtros se preparan mezclando la tierra de diatomeas purificada con asbesto y materia orgánica. Se mete en cilindros, se prensa, se deseca y se calienta a 2000 grados C para ligar los materiales.
- Filtro de Porcelana  
Estos consisten en cilindros de porcelana sin barnizar, la cual está compuesta de: silicato de alúmina y arena de cuarzo.
- Filtro de Vidrio:  
Estos filtros se preparan juntando vidrio pulverizado y puesto en un modo de forma de discos, se calienta a una temperatura que basta para formar una masa compacta de vidrio.
- Filtro de Nitrocelulosa y Teflón, tipo Membrana Millipore:  
Actualmente son los más usados. Estos son membranas de nitrocelulosa que se colocan en portafiltros de metal y por medio de presión positiva o negativa, se hace pasar los líquidos a través de los poros de las membranas. Existen membranas de diámetros que varían desde 10 mm hasta 25 cm. Por otra parte, el diámetro de los poros de cada membrana es también variable. Siendo las más comunes las que poseen poros con .22 y .45  $\mu\text{m}$ . El uso de filtros Millipore es de gran utilidad tanto en laboratorios de investigación como a nivel industrial. Hoy en día se ha logrado producir un sistema de ultrafiltración en los que es posible eliminar incluso moléculas mayores de 100,000 daltons. Estos sistemas permiten eliminar incluso partículas virales mayores y brindan la oportunidad de concentrar ciertos compuestos.

#### MÉTODOS QUÍMICOS (Desinfección)

Quando se utilizan agentes químicos por lo general se está hablando de desinfección, los cuales en su mayoría no tienen un efecto esterilizante, aunque destruyen virtualmente todos los microorganismos patógenos. Sólo algunos desinfectantes pueden tener efecto esterilizante cuando se usan aproximadamente, tal es el caso del formaldehído, el fenol, el gluteraldehído, el óxido de etileno y el peróxido de hidrógeno.



Los desinfectantes que no producen daño tisular y por lo tanto pueden aplicarse sobre superficies corporales, se les conoce como antisépticos, como ejemplo tenemos el alcohol etílico, el yodo la tintura de benzalconio, el cloruro de benzalconio, el mercurio cromo, etc.

La efectividad de los agentes químicos y su acción antimicrobiana depende de varios factores.

- **Concentración:** Muchos agentes son letales cuando son usados en altas concentraciones, otras en bajas concentraciones pueden ser bastante efectivas o solo retardar el crecimiento. La mayoría de los agentes químicos que son bactericida a las concentraciones indicadas son bacteriostáticos o concentraciones menores.
- **Tiempo y concentración** están en relación inversa o mayor concentración menor tiempo. Ejem. los compuestos fenólicos diluidos al doble se incrementan 64 veces el tiempo requerido de esterilización.

Con relación al tiempo no todos los microorganismos mueren al mismo tiempo independientemente de la concentración.

- **El pH** afecta a los dos, bacterias y al compuesto químico. El pH aumenta la carga afectando la concentración que actúa sobre la superficie celular. También afecta sobre el grado de ionización de los compuestos químicos. Las formas no ionizadas de los compuestos atraviesan la membrana celular en forma más fácil que los compuestos ya ionizados.
- **Temperatura:** Las reacciones químicas aumentan con energía lo mismo sucede con la actividad bactericida de los componentes. Cada 10 grados C aumenta al doble la actividad bactericida y con algunos de los componentes como fenoles el efecto aumenta en 5 ó 10 veces.
- **Naturaleza del Organismo:** Dependiendo de la composición química de los microorganismos, el estado que guarda en la curva de crecimiento y la presencia de estructuras como esporas y cápsula y el número de bacterias en el medio.
- **Presencia de Material Extraño:** La presencia de material orgánico (suero, sangre, exudado purulento, etc.) puede inactivar a los compuestos siendo los desinfectantes afectados por:
  - a. Absorción del compuesto por proteínas coloidales.
  - b. Formación de compuestos inertes o menos activos.
  - c. Unión de compuestos a grupos activos de proteínas extrañas, los más afectados son las anilinas, los mercuriales y los detergentes catiónicos.



## Mecanismos de Acción:

Estos son muy variados dependiendo del compuesto, pudiendo existir efectos primarios y secundarios.

En forma general podemos decir que actúan por inducción de cambios químicos en diferentes componentes de la célula, los que podemos dividir en:

- a. Daño a la membrana celular.
- b. Inactivación irreversible de proteínas.
- c. Destrucción del RNA.

Los que producen daño a la membrana afectan la organización de la membrana y sus funciones.

Exponer la membrana a detergentes o solventes produce desorganización de la estructura, por lo tanto mal funcionamiento.

En general es salida de metabolitos e interferencia con el transporte activo y metabolismo energético.

## Agentes Surfactantes

Intervienen alterando la tensión superficial, son ampliamente usados en la industria y casas, poseen grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, afectan principalmente a la parte de lípidos de la membrana, pueden ser aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfotéricos.

Los más importantes son los catiónicos. El residuo hidrofóbico es neutralizado por el grupo positivo como sucede con los cuaternarios de amonio. El grupo positivo se une al fosfato de los fosfolípidos, mientras que la parte hidrofóbica del interior de la membrana, pérdida de la permeabilidad selectiva salida de P, N<sub>2</sub> y otras sustancias, una vez alteradas, la membrana penetra y actúa desnaturalizando proteínas. Son más efectivos en pH alcalino, amplio espectro, los grampositivos son más susceptibles.

Los aniónicos como jabones y ácidos grasos, estos agentes producen disociación dando por resultado iones negativos, son más efectivos en pH ácidos y contra grampositivos ya que los gramnegativos presentan el LPS en pared celular. Producen daño por la destrucción de lipoproteína de la membrana celular. Se repelen por la carga negativa de la bacteria. Los detergentes no iónicos no son tóxicos y aún más promueven el crecimiento bacteriano. Ejemplo, el Tween 80.

## Fenoles

Produce daño de la membrana con salida del contenido y lisis, bajas concentraciones, produce precipitación de proteínas, enzimas como deshidrogenasas y por oxidasas que están



en la membrana son inactivadas produciendo daño irreversible (bactericida).

Fueron muy usados desde Lister 1865, pero actualmente han sido substituidos por compuestos menos tóxicos y causticos. La acción del fenol ha sido incrementada por la substitución en el núcleo fenólico de compuestos como derivados clorados y alcalinos, los cuales son más bactericidas y menos tóxicos. Por su poca solubilidad en agua se unen a agentes emulcificantes como: jabones que aumentan su capacidad. Como ejemplo de fenoles alcalinos tenemos los crisoles "La creolina". Los halogenados como lo es el hexaclorofeno es muy efectivo contra grampositivos, especialmente staphylococcus y streptococcus bactericida en altas concentraciones, pueden ser mezclados con jabones para cosmetología.

### Solventes orgánicos

- Alcoholes: Los alcoholes alifáticos, ej. etanol son los más usados, son bactericidas y remueven los lípidos, si matan esporas a temperaturas normales, no es recomendado para esterilizar, más bien para usos clínicos. Es más efectivo contra gram-positivos que contra gramnegativos y ácidos resistentes, diluciones de 50% o 70% del isopropil alcohol es más eficiente y menos volátil.
- Alcalis y Ácidos: La actividad antimicrobiana de estos compuestos radica en sus iones OH y H<sup>+</sup> sobre las moléculas no disociadas y por la alteración del pH del medio donde se encuentran las bacterias. La potencia de ácidos y alcalis inorgánicos depende de la capacidad de disociación que estos presenten, se debe tomar en cuenta también el poder tóxico directo de los alcalis metálicos sobre el organismo.

Los ácidos orgánicos aunque presentan menos capacidad que los ácidos inorgánicos. Ejem. ácido benzoico es siete veces más efectivo que el ácido hidroclorehídrico. El ácido benzoico se usa en la preservación de alimentos demostrando que no solo los iones son activos sino la molécula completa y su radicales, otro ejemplo es la acumulación de ácido láctico en un cultivo que primero frena y luego inhibe el crecimiento, su uso es principalmente en preservación de alimentos.

- Agentes que destruyen o modifican grupos activos de proteínas:

Toda enzima contiene grupos activos donde se une los catalizadores que duran origen a la reacción enzimática, la alteración de estos grupos dará como resultado la inactivación o desnaturalización de proteínas.

- Metales Pesados: Sales solubles de mercurio, arsénico, plata y otros son dañinos para las enzimas, éstas al reaccionar con los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteina



producen mercaptidos, en este momento la reacción es reversible si es que en el medio se encuentran grupos sulfhidrilo libres como por los proporcionados por el glutatión o el tioglicolato de sodio. Existen varios compuestos los cuales utilizan el mercurio como son: cloruro de mercurio, es tóxico y de uso limitado; mercuriales orgánicos son más usados el metafen, merthiolate, mercurocromo son menos tóxicos, se usan como antisépticos.

Los compuestos de plata se usan ampliamente como antisépticos. Se presentan en forma de sales solubles de plata o en forma coloidal. Las sales inorgánicas de plata son bastante eficaces, como bactericidas pero son muy irritantes y causticas. Ejem. nitrato de plata. Los compuestos coloidales de plata están formados por la unión de las sales de plata a proteínas y en las cuales los iones de plata se liberan lentamente se emplean como antisépticos, son bacteriostáticos, pobres bactericidas, se usan frecuentemente en oftalmología.

- Agentes Oxidantes: Halógenos,  $H_2O_2$ , Permanganato de potasio. Actúan sobre los grupos funcionales S H transformándolos en S.S.

Los compuestos oxidantes muy poderosos actúan también sobre los grupos amino y grupos hidroxifenólicos de la cisteína.

### Halógenos

El agente más empleado de este grupo es el cloro y el hipoclorito. Se emplea principalmente en la industria y su concentración se expresa en partes por millón.

Las suspensiones de bacterias y virus son altamente susceptibles al ataque por hipoclorito; así se ha indicado que la inactivación completa del virus de la poliomielitis a 0.05 p.p.m. transcurre en 15 minutos.

En limpieza de equipos industriales, la concentración de cloro recomendada está entre 20 y 200 p.p.m., confiriendo estos valores gran margen de seguridad. En purificación de agua a gran escala como en albercas, se emplean cilindros de cloro líquido con dispositivos de control automático.

El yodo es otro halógeno usado como desinfectante. Es el más eficaz desinfectante de piel, generalmente se usa en soluciones alcohólicas para aplicación tópica. El yodo coloidal se emplea como antiséptico intestinal y como parasiticida. El yodo en combinación con otros productos químicos forma compuestos muy eficaces y estables, como ejemplo tenemos el biyoduro de mercurio. El fluor y el bromo son demasiado energéticos y tóxicos para ser usados como desinfectantes.

### Otros Oxidantes



En este grupo tenemos dos agentes: el peróxido de hidrógeno, el cual es un oxidante activo que se descompone fácilmente en agua y oxígeno siendo su fórmula  $H_2O_2$ , se le llama comúnmente agua oxigenada, se considera capaz de destruir esporas de antrax en una hora.

El permanganato de potasio es un oxidante energético. Su actividad aumenta en solución ácida, por ejemplo una solución con un 1% de permanganato de potasio y 1.1% de ácido clorhídrico en agua, destruye las esporas de antrax en 30 segundos. Su principal uso es en vapores pero estos son tóxicos para el humano y los animales.

### Agentes alquilantes

Como el formaldehído y el óxido de etileno reemplazan los iones hidrógeno de los grupos  $NH_2$  y  $OH$ , los cuales son abundantes en proteínas y ácidos nucleicos y también en los grupos  $COOH$  y  $SH$  de las proteínas. La acción del formaldehído es en parte reversible, pero la gran energía que se produce con el óxido de etileno hace irreversible la acción. Estos agentes alquilantes, en contraste con otros desinfectantes, son más activos contra esporas y formas vegetativas, posiblemente por su poder de penetración y que no necesitan agua para actuar.

El formaldehído es un gas, usualmente fabricado a 37% en solución acuosa. Ha sido usado comúnmente al 0.1% en la preparación de vacunas, destrucción de bacterias, inactivación de toxinas o virus, sin destrucción de su antigenidad.

El óxido de etileno, es un gas altamente soluble en agua. Ha probado ser la sustancia gaseosa más eficaz en la desinfección de superficies secas. Sin embargo, su acción es lenta, su uso es caro y existe el riesgo de toxicidad residual. Su acción mutágena y cancerígena para el hombre está siendo investigada.

### Anilinas

Las más usadas son trifenilmetano, verde brillante, verde malaquita y cristal violeta.

- Selectivos de grampositivos Staphylococcus más susceptibles.
- La acción de todos no ha sido determinada.
- La violeta de genciana interfiere en la síntesis de péptidoglicano, ácido UDP-acetylmurámico a péptido UDP acetylmuramilo.
- En gram negativas el LPS impide entrar al violeta de genciana acridinas o flavinas (color amarillo). Proflavina y acroflavina son antisépticos pero en presencia de suero o pus no actúan.

Las acridinas interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas en procariotes y eucariotes. Interactúan con la doble cadena de DNA. Se insertan entre dos bases de DNA



separándola físicamente y al replicarse la cadena se presenta una nueva base en la cadena de nueva formación.



## REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud: Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Ginebra 1983.
2. National Academy of Sciences. 1978: Laboratory Animal Housing. Proceeding of a Symposium hold at Hunt Valley, 22 - 23 september 1976.
3. Phillips, G. B. 1966 Microbiological Barrier Techniques P. 105 - 135.
4. Standars Association of Australia 1979. Code of practice for safety in laboratories. North Sydney, NSW, Standard Association of Australia (As 2243, parts 1-1).
5. N.S. Department of Health and Human Services. 1976 Biological Safety Manual for Research Involving Oncogenic viruses. Publication No. (NIH) 16 - 1165. National Cancer Institute Bethesda, M.D.
6. Runkle, R.S. and G.E. Philips 1969. Microbial contamination control facilities. Van Nostrand Reinbold co., N. York.
7. Collins C.H. and Lyne, P.M. 1979. Microbiologic methods 4a. ed. London, Butter - Worths.
8. Boyers. B.I. 1979 How to use and check pipetting. Anaheim Ca. Scientific Newsletter, Inc.
9. Standars Association of Australia 1980. Laminar flow biological safety cabinets (class II) for personal and product protection. North Sydney, NSW, Standard Association of Australia (As 2252, part 2.).
10. Kelsey, J.C. and Meurer, I.M. 1972. 'The use of chemical disinfectants in hospitals. London, H.M. Stationery office (PHLS Monograph No 2, Willis, A.T. Collins, C.H.).
11. Perkins, J.J. 1972 Principles and methods of sterilization in health sciences, Thomas Springfield, IL.
12. Fusceldo, A.A. B.J. Erlick, and B. Hidman 1980. Laboratory Safety, Theory and Practice. Academic Press. Inc., New York.





INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACIÓN PARA LA AGRICULTURA

1a Avenida 8-00, zona 9 Telefonos 62496, 62306, 316304 Apartado Postal 1815 Cable IICA-Telcel IICA GT- Guatemala

Digitized by Google