

PRÀCTIQUES DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Ana M. Marqués Villavecchia (coordinació)

Ana M. Marqués Villavecchia
Maribel Farfán Sellarés
Núria Rius Bofill

Laboratori de Microbiologia
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries



PRÀCTIQUES DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Ana M. Marqués Villavecchia (coordinació)

Ana M. Marqués Villavecchia
Maribel Farfán Sellarés
Núria Rius Bofill

Laboratori de Microbiologia
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

Publicacions i Edicions



UNIVERSITAT DE BARCELONA



INTRODUCCIÓ

L'objectiu d'aquest llibre és tenir una guia per facilitar el desenvolupament de les pràctiques de microbiologia clínica de l'assignatura Microbiologia i Parasitologia Clíniques de la Llicenciatura de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Aquestes pràctiques s'adrecen a estudiants que ja han cursat una microbiologia general (Microbiologia I i II) i que, per tant, coneixen els microorganismes i les tècniques de manipulació bàsiques.

El Laboratori de Microbiologia Clínica té un paper important en el diagnòstic i el control de les malalties infeccioses. Per poder esbrinar quin és el microorganisme o microorganismes responsables d'un procés infecciós és necessari que s'hagi recollit una mostra representativa de la zona infectada amb un mínim de contaminació de biota normal. És també necessari que la mostra es transporti ràpidament i de forma adequada al laboratori i que es facin les sèmbrs, les proves serològiques i/o les tècniques moleculars que posin de manifest la presència d'un determinat microorganisme.

Els últims anys les tècniques microbiològiques s'han desenvolupat molt, fet que permet un diagnòstic més ràpid o més acurat. Però el criteri microbiològic que permet decidir que un determinat microorganisme aïllat és el responsable d'un procés infecciós s'aprèn amb un bon mestre i amb experiència pràctica. Així doncs, la realització de les pràctiques és un pas essencial en l'aprenentatge d'aquesta matèria.

Durant les pràctiques de microbiologia clínica es tracten algunes pautes analítiques que es desenvolupen en el programa teòric. Cada pràctica consta d'una introducció sobre les característiques fisiològiques i microbiològiques de l'hàbitat que s'estudia, i a continuació s'explica l'objectiu i el procediment de la pràctica que s'ha de dur a terme, és a dir, com s'han de recollir i transportar les mostres i com s'han d'analitzar per identificar el microorganisme o microorganismes responsables del procés infecciós. Per motius de seguretat, de manca d'infraestructura o per causes econòmiques hi ha alguns aspectes analítics que no es poden dur a terme completament, però sí de manera suficient per conèixer el seu procediment i arribar fins un resultat útil.

El llibre de pràctiques s'ha organitzat en nou capítols. En el capítol I s'expliquen les mesures de seguretat i els diferents tipus de laboratoris depenent de l'origen de la mostra i del microorganisme que es manipuli. També es detallen les Normes generals d'actuació en els laboratoris docents i les Normes d'eliminació de residus desenvolupades a la Facultat de Farmàcia. La lectura d'aquest capítol és obligatòria abans d'iniciar les pràctiques per tal de conèixer com es treballa de manera segura en el Laboratori de Microbiologia.

En el capítol II s'inicia la part pràctica amb l'explicació del coprocultiu com a model d'anàlisi microbiològica d'una mostra amb una concentració molt elevada de biota normal i la recerca del possible patògen. L'urinocultiu i la seva anàlisi s'estudien en el capítol III. En aquest cas tenim una mostra que és estèril en una persona sana però que es pot contaminar durant la presa de la mostra. En el capítol IV es descriu la realització de l'antibiograma. L'estudi de la sensibilitat als agents antimicrobians és una part important en qualsevol anàlisi i permet que el metge estableixi un tractament adequat del procés infecciós.

Durant les pràctiques també es fa un estudi de portadors nasals de *Staphylococcus aureus* i *Neisseria* sp. (capítol V). Els mateixos alumnes fan la presa de mostres a un company i el seu estudi posterior. Aquestes dades permeten establir al final de les pràctiques la incidència d'aquests microorganismes en persones sanes.

Tant per a estudis sobre l'origen d'algunes infeccions nosocomials com per possibles problemes de contaminació que es puguin presentar en el Laboratori de Microbiologia és convenient fer controls ambientals microbiològics. Els mètodes més habituals es descriuen en el capítol VI. En el capítol VII es tracta el problema de la tuberculosi i la importància que encara té la tinció de Ziehl-Neelsen en el diagnòstic presumptiu d'aquesta malaltia.

Finalment, en els capítols VIII i IX es descriuen els medis de cultiu, les solucions i els colorants emprats durant les pràctiques, i els mètodes d'esterilització més freqüents en un laboratori de microbiologia, respectivament.

L'assignatura Microbiologia i Parasitologia Clíniques és una assignatura troncal de la llicenciatura de Farmàcia. Aquest llibre recull les pràctiques de microbiologia clínica que es duen a terme de manera intensiva durant una setmana. La realització de les pràctiques durant dies consecutius és imprescindible en microbiologia, ja que el treball amb microorganismes comporta períodes d'incubació per obtenir els resultats dies després.

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ	I
ÍNDIX	III
ESQUEMA DE PRÀCTIQUES	IX
CAPÍTOL I	
1.- SEGURETAT EN EL LABORATORI DE MICROBIOLOGIA	
I ELIMINACIÓ DE RESIDUS	1
1.1. Normes generals d'actuació en els laboratoris	1
1.2. Treball amb agents biològics: Laboratori de Microbiologia	3
1.3. Vies d'entrada	5
1.4. Avaluació dels riscs	5
1.5. Principis de bioseguretat	6
1.6. Tipus de laboratoris segons el nivell de seguretat biològica	6
1.6.1. Laboratori de bioseguretat 1 (LBS 1)	6
1.6.2. Laboratori de bioseguretat 2 (LBS 2)	7
1.6.3. Laboratori de bioseguretat 3 (LBS 3)	9
1.6.4. Laboratori de bioseguretat 4 (LBS 4)	10
1.7. Bibliografia	11
CAPÍTOL II	
2.- EL COPROCULTIU	13
2.1. Observació directa de la mostra de femta	16
2.1.2. Tinció de Gram	16
2.2. Aïllament en medis selectius i diferencials	17
2.2.1. Agar MacConkey	17
2.2.2. Agar XLD (xilosa lisina desoxicolat)	17
2.3. Enriquiment en brou de Rappaport-Vassiliadis peptona de soja (R-V)	18
2.4. Aïllament en agar SS a partir del cultiu d'enriquiment en brou R-V	19
2.5. Lectura dels cultius en medis sòlids selectius i diferencials	19
2.5.1. Lectura de les plaques d'agar MacConkey	20
2.5.2. Lectura de les plaques de l'agar XLD	20

2.6. Proves bioquímiques per a la identificació presumptiva	21
2.6.1. Prova de Kligler	21
2.6.2. Prova de LIA	22
2.6.3. Cultiu pur en tub d'agar TSA inclinat	22
2.7. Lectura de l'agar SS	23
2.7.1. Lectura de les plaques de l'agar SS	23
2.8. Lectura de proves per a la identificació presumptiva	24
2.8.1. Lectura de la prova de Kligler	24
2.8.2. Lectura de la prova LIA	25
2.8.3. Lectura conjunta de les dues proves Kligler i LIA	26
2.9. Proves addicionals	26
2.9.1. Tinció de Gram	26
2.9.2. Prova de l'oxidasa	28
2.9.3. Prova de l'O/F	29
2.10. Identificació completa: sistema ràpid d'identificació API 20E	29
2.11. Estudi de la sensibilitat als antimicrobians	31
2.12. Lectura de la prova de l'O/F	31
2.13. Lectura de l'API 20E	31
2.14. Proves complementaries: reducció de nitrats	34
2.15. Confirmació de la identificació	35
2.16. Bibliografia	35
2.16. Esquema de la pràctica	36
CAPÍTOL III	
3. L'URINOCULTIU	37
3.1. Observació directa	39
3.1.1. Tinció de Gram directa de l'orina	39
3.1.2. Observació del sediment	40
3.1.3. Mètodes químics: tires reactives d'orina	42
3.2. Cultiu	42
3.2.1. Recompte del nombre de bacteris presents en l'orina	42
3.2.2. Aïllament en agar MacConkey	43
3.3. Lectura dels cultius	44
3.3.1. Lectura del recompte en agar CLED	44
3.3.2. Lectura de l'aïllament en agar MacConkey	46
3.4. Identificació del microorganisme responsable de la infecció	47
3.4.1. Tinció de Gram	47
3.4.2. Prova de l'oxidasa	47
3.4.3. Prova de l'O/F	47
3.4.4. Sistema d'identificació API 20E	48
3.4.5. Prova del PGUA/INDOL	48
3.5. Estudi de la sensibilitat als antimicrobians	49
3.6. Lectura de les proves bioquímiques	49
3.5.1. Lectura de la prova de l'O/F	49
3.5.2. Lectura de l'API 20E	49

3.5.3. Lectura de la prova PGUA/INDOL.....	49
3.7. Bibliografia.....	49
3.7. Esquema de la pràctica.....	50
CAPÍTOL IV	
4. ESTUDI DE LA SENSIBILITAT ALS AGENTS ANTIMICROBIANS: L'ANTIBIOGRAMA.....	51
4.1. L'antibiograma.....	52
4.2. Lectura del antibiograma.....	54
4.3. Bibliografia.....	56
CAPÍTOL V	
5. ESTUDI DELS PORTADORS NASALS DE <i>Staphylococcus aureus</i> I <i>Neisseria</i> sp.....	57
5.1. Presa de mostres i cultiu per determinar la presència de portadors sans de l' <i>S. aureus</i> i <i>Neisseria</i> sp.....	58
5.1.1. Agar Sang.....	59
5.1.2. Agar Mannitol Hipersalí (MSA).....	59
5.2. Lectura de la placa d'agar Sang.....	60
5.2.1. Tinció de Gram.....	60
5.2.2. Prova de l'oxidasa.....	61
5.3. Lectura de la placa d'agar mannitol hipersalí.....	62
5.3.1. Tinció de Gram.....	63
5.3.2. Prova de la Catalasa.....	63
5.4. Identificació de les colònies sospitoses de ser <i>S. aureus</i>	63
5.4.1. Prova de l'O/F.....	64
5.4.2. Prova de la DNasa.....	64
5.4.3. Sembra en un tub de TSB.....	65
5.5. Lectura de les proves d'identificació.....	65
5.5.1. Lectura de l'O/F.....	65
5.5.2. Lectura de la DNasa.....	65
5.5.3. Prova de la Coagulasa.....	65
5.6. Resultats obtinguts.....	66
5.7. Bibliografia.....	67
5.8. Esquema de la pràctica.....	68
CAPÍTOL VI	
6. CONTROL MICROBIOLÒGIC AMBIENTAL.....	69
6.1. Control microbiològic de superfícies.....	69
6.1.1. Mètode de la placa de contacte (placa RODAC).....	69
6.2. Control microbiològic de l'aire.....	70
6.2.1. Obtenció de mostres d'aire.....	71
6.2.2. Elecció del sistema de mostreig.....	71
6.2.3. Recompte de bacteris aerobis mesòfils pel mètode de sedimentació.....	72
6.2.4. Recompte de bacteris aerobis mesòfils amb aerocentrífuga.....	72

CAPÍTOL VII

7. TINCIÓ DE ZIEHL-NEELSEN: DIAGNÒTIC PRESUMTIU

DE LA TUBERCULOSI I DE LES MICOBACTERIOSIS	75
7.1. Tinció de Ziehl-Neelsen d'una mostra problema	77
7.1.1. Preparació de l'extensió	77
7.1.2. Tinció	78
7.1.3. Lectura	78
7.1.4. Resultats	79

CAPÍTOL VIII

8. COMPOSICIÓ DE LES SOLUCIONS, ELS MEDIS DE CULTIU,

ELS REACTIUS I ELS COLORANTS EMPRATS A LES PRÀCTIQUES	81
8.1. Solucions salines	81
8.1.1. Solució de Ringer $\frac{1}{4}$	81
8.2. Medis de cultiu	81
8.2.1. Brou tripticasa de soja (TSB)	81
8.2.2. Brou Rappaport-Vassiliadis	82
8.2.3. Agar CLED	82
8.2.4. Agar DNasa	82
8.2.5. Agar Kligler	82
8.2.6. Agar LIA (lisina ferro agar)	83
8.2.7. Agar manitol hipersalí (MSA)	83
8.2.8. Agar MacConkey	83
8.2.9. Agar Mueller-Hinton	84
8.2.10. Agar O/F (medi d Hugh-Leifson)	84
8.2.11. Agar Sang	84
8.2.12. Agar SS (Salmonella-Shigella)	85
8.2.13. Agar tripticasa de soja (TSA)	85
8.2.14. Agar XLD (xilosa lisina desoxicolat)	85
8.3. Reactius	86
8.3.1. Reactiu per al TDA	86
8.3.2. Reactiu de Barrit	86
8.3.3. Reactiu de Griess	86
8.3.4. Reactiu per a la catalasa	86
8.3.5. Reactiu de Kovacs	86
8.3.6. Reactiu de l'oxidasa	87
8.4. Colorants	87
8.4.1. Alcohol d'Ebner	87
8.4.2. Blau de metilè	87
8.4.3. Cristall violeta (modificació de Hucker)	87
8.4.4. Fucsina fenicada	87
8.4.5. Lugol	88
8.4.6. Safranina	88

CAPÍTOL IX

9. ESTERILITZACIÓ	89
9.1. Esterilització física	89
<i>9.1.1. Temperatura elevada</i>	89
<i>9.1.2. Esterilització per filtració</i>	91
<i>9.1.3. Radiació</i>	92
9.2. Esterilització química	92
<i>9.2.1. Òxid d'etilè</i>	92
<i>9.2.2. β-propiolactona</i>	93
<i>9.2.3. Glutaraldehyd</i>	93
<i>9.2.4. Formaldehyd</i>	93
9.3. Preparació del material que s'ha d'esterilitzar	93

ESQUEMA DE LES PRÀCTIQUES

	DILLUNS	DIMARTS	DIMECRES	DIJOUS	DIVENDRES
SEGURETAT EN EL LABORATORI	Descontaminació de la taula de treball. Rentada de mans.	Descontaminació de la taula de treball. Rentada de mans.	Descontaminació de la taula de treball. Rentada de mans.	Descontaminació de la taula de treball. Rentada de mans.	
COPROCULTIU	Observació directa: tinció de Gram. Sembra en: agar MacConkey, agar XLD, brou Rappaport-V.	Sembra de colònies sospitoses: Kligler, LIA i TSA inclinat. Sembra en: agar SS.	Identificació per API 20E. Proves addicionals: O/F, oxidasa. Lectura de la placa SS.	Lectura: API 20E. Lectura de proves addicionals. Identificació.	
URINOCULTIU	Observació directa (Gram) o sediment. Recompte en agar CLED. Sembra en agar MacConkey	Lectura recompte. Identificació presumptiva d' <i>E. coli</i> : tinció de Gram, oxidasa, sembra en tub TSA inclinat.	Prova ràpida: PGUA/Indol, lectura en 4 hores.		
PORTADORS NASALS	Presa de mostres. Sembra en: agar Sang MSA.	Incubació	Lectura de plaques: tinció de Gram. Proves de la catalasa, O/F, DNasa, oxidasa, sembra en tub TSA inclinat.	Lectura de proves: O/F, DNasa, coagulasa. Identificació.	
ESTUDI DE SENSIBILITAT ALS ANTIMICROBIANS		Realització de l'antibiograma.	Lectura de l'antibiograma (realització de l'antibiograma).	(Lectura de l'antibiograma).	
DIAGNÒSTIC PRESUMPTIU DE TUBERCULOSI		Tinció de Ziehl-Neelsen i valoració.			
CONTROL AMBIENTAL	Presa de mostres d'aire amb aerocentrífuga i exposició de plaques. Sembra de plaques RODAC.	Incubació	Lectura de la tira d'aerocentrífuga i de plaques RODAC.		
MATERIAL	Esterilitzar.	Esterilitzar i rentar.	Esterilitzar i rentar.	Esterilitzar i rentar.	
EXAMEN				EXAMEN	

CAPÍTOL I

1. SEGURETAT EN EL LABORATORI DE MICROBIOLOGIA I ELIMINACIÓ DE RESIDUS

L'objectiu d'aquest capítol és conèixer els riscos que comporta treballar en un laboratori de microbiologia i aprendre a treballar de manera segura.

Durant les pràctiques de microbiologia clínica es treballarà amb mostres d'origen humà procedents de persones sanes. Per tant, aquestes mostres en principi no contindran microorganismes patògens però sí microorganismes de la biota normal. Amb aquestes mostres haurem de treballar en un laboratori amb un nivell de seguretat 2, ja que no es pot descartar totalment la possible presència d'un patògen.

Abans de començar les pràctiques és obligatori llegir aquest capítol per tal de conèixer i assumir quines són les normes de seguretat necessàries en funció dels possibles microorganismes que s'aïllin en les mostres. Aquestes normes es basen en el Reial decret 664/1997, de 12 de març, sobre la protecció dels treballadors contra els riscos relacionats amb l'exposició a agents biològics durant el treball (BOE núm. 124, de 24 de maig).

Per fer les pràctiques de microbiologia s'ha de portar:

- Bata blanca.
- Ulleres de seguretat.
- Retolador de vidre per marcar els tubs i les plaques que s'emprin.
- Llumins o encenedor per al bec Bunsen.
- Llibre de pràctiques.

1.1. Normes generals d'actuació en els laboratoris

En els laboratoris docents de la Facultat de Farmàcia, com a conseqüència de les pràctiques que s'hi fan, hi ha una sèrie de riscos químics, biològics, mecànics, elèctrics, etc., que s'han de reduir al màxim. Per aquesta raó, la Unitat de Laboratoris Docents (ULD) de la Facultat de Farmàcia ha establert les **Normes generals d'actuació en els laboratoris docents de la Facultat de Farmàcia**, que són les següents:

Abans de començar a treballar al laboratori cal que us familiaritzeu amb els elements de seguretat següents:

- Vies d'evacuació: sortides del laboratori i sortides de l'edifici.
- Extintors, mànegues i mantes ignífugues.
- Farmacioles, dutxes d'emergència, rentaüls, armaris de seguretat.
- Informació sobre què cal fer en cas d'emergència (mireu les instruccions al tauler d'anuncis de suro).
- Pla d'emergència.

Equips de protecció individual (Norma 1/98 de la UB)

- L'ús de bata és obligatori dins el laboratori, i cal portar-la cordada en tot moment.
- L'ús d'ulleres de seguretat homologades segons la normativa de la UE (amb protecció contra impactes o esquixos frontals i perifèrics) és obligatori sempre que es manipuli qualsevol producte o material que, per les seves característiques, pugui representar un risc per a la seguretat i la salut de les persones.
- Mai no heu de dur lents de contacte al laboratori, ja que, en cas d'accident, els productes químics, ja sigui en estat líquid (esquixades), ja sigui en forma de vapor, poden passar al darrere de les lents i provocar lesions als ulls abans de poder-les retirar.

Normes de comportament

- No fumeu, no mengeu ni beveu en el laboratori.
- No guardeu aliments ni begudes a les neveres o als congeladors del laboratori.
- No tasteu ni toqueu amb les mans cap producte químic ni biològic.
- Renteu-vos les mans correctament abans i després de realitzar un experiment i en sortir del laboratori.
- Els cabells llargs representen un risc: cal que els dugeu recollits.
- S'aconsella no portar faldilles, pantalons curts, mitges ni sandàlies.
- No porteu polseres, penjolls, mànigues amples, etc. que puguin enganxar-se.

Condicions de l'àrea de treball

- L'àrea de treball s'ha de mantenir neta i endreçada.
- No deixeu objectes personals (llibres, abrics, bosses, etc.) damunt de les taules de treball. Deixeu-los a les taquilles que hi ha al passadís.
- Si es vessa un producte, recolliu-lo immediatament, prenent sempre les mesures pertinents. Disposeu de productes específics per recollir àcids, bases i solucions orgàniques als passadissos.

Manipulació de productes químics i biològics

- No pipetegeu mai amb la boca: empreu sempre els dispositius destinats a aquest efecte.
- No introduïu mai la pipeta dins l'ampolla del reactiu.
- No porteu tubs d'assaig ni productes dins les butxaques.
- La manipulació de qualsevol producte que pugui desprendre vapors tòxics, corrosius, irritants o lacrimògens s'ha de fer sempre a les vitrines extractores.
- Si manipuleu productes tòxics o corrosius, empreu els guants que siguin adequats en cada cas.
- Si treballeu amb mostres biològiques, empreu els guants idonis, i en cas que siguin patògens, manipuleu-les en cabines de bioseguretat.
- Vigileu a l'hora d'examinar les olors: no ho feu mai directament; arrossegueu amb la mà i cap al nas una porció del vapor que vulgueu ensumar.

Escalfament de líquids

- No escalfeu mai en recipients totalment tancats. Dirigiu l'obertura del recipient en direcció contrària a un mateix i a d'altres persones properes.
- Quan bulliu, introduïu dins el recipient —si és possible— boles de vidre o de porcellana porosa per tal d'evitar les esquixades.
- Si el líquid és inflamable, no escalfeu mai amb flama.

Identificació

- Tots els productes que cal utilitzar han d'estar etiquetats correctament.
- Abans d'usar un determinat reactiu, llegiu amb atenció l'etiqueta i, si és possible, la fitxa de seguretat. Assegureu-vos bé que no empreu un producte per un altre.
- Etiqueteu degudament les solucions preparades al laboratori.

Neteja del material

- Una vegada utilitzat el material, cal que el deixeu perfectament net, seguint les indicacions del professorat.
- La neteja del material s'ha de fer immediatament després de cada operació, ja que és més fàcil eliminar-ne la brutícia i així, a més, es coneix la naturalesa de la substància.
- Mai no heu de posar el material volumètric dins l'estufa.

Eliminació de residus

- Des del juny del 1996, la Facultat de Farmàcia disposa d'un Pla de gestió de residus basat en els principis de reducció, reciclatge i reutilització. Per gestionar adequadament els residus, cal dipositar-los als contenidors que trobareu a la Facultat, segons la classificació següent:

Material no contaminat i sense restes de productes químics:

- Paper i cartró (contenedor de plàstic blau)
- Vidre net (contenedor de plàstic verd)
- Plàstic (contenedor de plàstic groc)

Material contaminat:

- Contenedor de plàstic groc (Chemo-Box): pipetes, xeringues i altres objectes punyents
- Bidons blaus: per a qualsevol tipus de material tòxic o contaminat
- Contenidors de plàstic blanc per a l'eliminació de:
 - Dissolvents no halogenats (etiqueta verda)
 - Dissolvents halogenats (etiqueta taronja)
 - Solucions aquoses àcides (etiqueta blava)
 - Solucions aquoses bàsiques (etiqueta groga)
 - Residus químics específics (etiqueta vermella)
- En qualsevol altre cas, consulteu el manual de residus.

1.2. Treball amb agents biològics: Laboratori de Microbiologia

A més a més d'aquestes normes generals, en un laboratori de microbiologia, on es treballa amb microorganismes, o en un laboratori de diagnòstic microbiològic, on arriben mostres d'origen humà que desconexem si estan contaminades o el grau de perillositat i la forma de transmissió del

possible patogen present, s'ha de treballar amb unes mesures de seguretat biològica per reduir al màxim el risc d'exposició al possible patogen i evitar les infeccions adquirides en el laboratori (IAL). Per tant, un dels objectius d'aquest capítol és conèixer els riscos que comporta treballar en un laboratori de microbiologia i aprendre a treballar de manera segura amb agents biològics.

S'entén per *exposició als agents biològics* la presència d'aquests en l'entorn laboral. Segons el tipus d'exposició, es poden classificar en les categories següents:

- Exposició per manipulació directa de l'agent biològic que constitueix el propòsit principal del treball.
- Exposició per manipulació de mostres però que no implica el contacte directe o l'ús deliberat de l'agent microbiològic (producció d'aliments, productes d'origen animal, depuració d'aigües residuals, etc.).
- Exposició que no deriva de la pròpia activitat laboral (contagi entre companys). Aquesta categoria no s'inclou en aquest capítol.

Segons el Reial decret 664/1997 ja esmentat, es consideren agents biològics els microorganismes, amb inclusió dels genèticament modificats, els cultius cel·lulars i els endoparàsits humans susceptibles d'originar qualsevol tipus d'infecció, al·lèrgia o toxicitat. D'acord amb el RD, els agents biològics es classifiquen en quatre grups en funció del risc d'infecció (taula 1.1).

Agents biològics del grup de risc	Risc infecció	Risc de propagació a la col·lectivitat	Profilaxi o tractament eficaç
1	Poc probable que causi malaltia	No	Innecessari
2	Pot produir una malaltia i constituir un perill per als treballadors	Poc probable	Possible generalment
3	Pot provocar una malaltia greu i constituir un perill seriós per als treballadors	Probable	Possible generalment
4	Provoquen una malaltia greu i constitueixen un perill seriós per als treballadors	Elevat	No conegut actualment

Taula 1.1. Classificació dels agents biològics

Com a conseqüència d'aquesta classificació, a l'annex II del Reial decret es presenta una llista d'agents biològics classificats en els grups 2, 3 o 4. Com a exemple, esmentarem alguns dels patògens més habituals en un laboratori de diagnòstic microbiològic amb el grup de risc al qual pertanyen (entre parèntesis): *Campylobacter jejuni* (2), *Chlamydia trachomatis* (2), *Enterococcus* sp. (2), *Escherichia coli* (excepte les soques no patògenes) (2), *E. coli* verotoxigènica (3), *Haemophilus influenzae* (2), *Mycobacterium tuberculosis* (3), *Salmonella* Enteritidis (2), *Salmonella* Typhi (3), *Staphylococcus aureus* (2), virus de l'hepatitis B (3), VIH (3), virus de l'herpes simple tipus 1 i 2 (2), virus d'Ebola (4), *Candida albicans* (2).

Si es coneix la identitat de l'agent biològic al qual està exposat un treballador, però no es troba a la llista de la classificació recollida a l'annex II del Reial decret, s'han d'estudiar les seves característiques com a agent infecciós i només quan s'hagi confirmat el seu caràcter no infecciós podrà ser classificat en el grup 1.

1.3. Vies d'entrada

En un laboratori de microbiologia les persones poden entrar en contacte amb els microorganismes per quatre vies diferents:

- *Inoculació percutània*: és una de les rutes més freqüents d'exposició i és conseqüència de punxades o talls amb material contaminat.
- *Inhalació*: la inhalació d'aerosols generats per accidents o per la manera de treballar és freqüent i és especialment important perquè moltes vegades passa desapercebuda.
- *Ingestió*: es produeix com a conseqüència de treballar de manera incorrecta i ficar-se a la boca material contaminat (pipetes, etc.) o altres objectes (llapis, dits, etc.).
- *Contacte amb la pell o amb les membranes mucoses*: la contaminació es produeix pel contacte de les membranes mucoses (boca, ulls, nas, etc.), petites ferides o talls a la pell amb superfícies contaminades.

S'ha de tenir en compte que en la gran majoria de les IAL (>80%) no es coneix la forma com s'han posat en contacte el microorganisme i el treballador. És a dir, s'ha produït un error en la manera de treballar, però no s'és conscient d'haver comès aquest error que ha permès al microorganisme posar-se en contacte amb alguna persona del laboratori. Només se sap que aquesta persona ha treballat amb el microorganisme o hi ha estat a prop.

Les IAL associades amb un accident conegut es poden relacionar amb la falta de cura o amb errors humans. Els accidents descrits amb més freqüència són la inhalació d'esquitxades, les punxades amb agulles de xeringues o amb objectes punyents i l'aspiració del contingut d'una pipeta.

1.4. Avaluació del risc

S'entén per *risc* la probabilitat que es produeixi un mal, una lesió o una malaltia. D'acord amb el Reial decret, quan s'identifica un risc relacionat amb l'exposició a agents biològics durant el treball, si no s'ha pogut evitar, s'ha d'avaluar. L'avaluació consta de dues etapes. Primer es duu a terme la identificació teòrica dels riscos biològics. Això es fa estudiant la identificació teòrica dels agents biològics, el grau de virulència (dosi infectiva mínima), la forma de transmissió, la via d'entrada, el volum i la concentració de l'agent en el material amb què es treballa, etc. Després s'avaluen els riscos que hi ha a la pròpia feina i els relacionats amb el treballador: l'estudi dels procediments de treball, la freqüència de l'exposició, l'avaluació del nivell d'exposició i de l'experiència, etc.

En un laboratori de diagnòstic microbiològic no se sap quins agents infecciosos hi ha a les mostres que arriben al laboratori. Se suposen. Per tant, és un repte establir el nivell de seguretat

adequat. Així doncs, sempre s'ha de treballar com a mínim amb un nivell de seguretat 2 (agents biològics que poden produir malalties).

1.5. Principis de bioseguretat

Per treballar de manera segura s'han de fer servir unes "barreres" durant el treball per tal de minimitzar el contacte dels treballadors i el medi ambient amb els microorganismes. Aquestes barreres es classifiquen en barreres primàries i secundàries. Les barreres primàries tenen com a finalitat protegir el personal i l'ambient del laboratori. Això s'aconsegueix principalment amb bones tècniques microbiològiques, és a dir, amb persones amb experiència i amb l'ús d'aparells de seguretat adequada. L'ús de vacunes pot incrementar el nivell de protecció personal però no és un substitut.

Les barreres secundàries pretenen protegir el medi ambient de l'exposició a materials infecciosos. Això s'aconsegueix amb una combinació del disseny i la ubicació del laboratori adequats.

1.6. Tipus de laboratoris segons el nivell de seguretat biològica

El nivell de seguretat assolit per un laboratori depèn d'una sèrie de factors humans (experiència de les persones), tècnics (aparells de seguretat disponibles), i infraestructura (disseny del laboratori i ubicació). Segons la combinació d'aquests factors, tindrem laboratoris amb diferent nivell de seguretat. En el laboratori de bioseguretat 1 es treballa amb bones tècniques microbiològiques (molt important) però no es fa servir un equip de seguretat especial ja que no és necessari en treballar amb microorganismes no patògens per a persones sanes. A mesura que s'incrementa el nivell de seguretat, les exigències en la manera de treballar augmenten.

1.6.1. Laboratori de bioseguretat 1 (LBS 1)

En aquest laboratori es pot treballar amb microorganismes que amb escassa probabilitat produeixin malaltia en l'adult sa. És un laboratori adequat per a la docència i per treballar amb microorganismes ben caracteritzats i no patògens.

Personal

És un laboratori adequat per a estudiants que s'inicien en el treball microbiològic. La supervisió del treball l'ha de fer un científic amb capacitat general en microbiologia.

Pràctiques de laboratori

Un LBS 1 té l'accés limitat (porta tancada), es treballa sempre en la lleixa i se segueixen i s'adquireixen les pràctiques microbiològiques bàsiques:

Normes de comportament

- Està prohibit menjar, beure, mastegar xiclet, fumar o maquillar-se.
- Els aliments s'han d'emmagatzemar en neveres especials i fora de la zona de treball.
- L'ús de la bata cordada és obligatori.
- L'ús de les ulleres de seguretat és obligatori en els procediments que generin esquitxades.

Forma de treballar

- Es treballa a prop del bec Bunsen encès. Cal tenir precaució quan la flama està encesa.
- S'ha de treballar minimitzant la formació d'aerosols i esquitxades.
- Les nanses de sembra (Kolle, picadura, Digrafsky) s'esterilitzen abans i després del seu ús.
- Està prohibit pipetejar amb la boca.
- El líquid de la pipeta s'expulsa suaument, contra la paret del contenidor per evitar esquitxades.
- En fer servir qualsevol tipus de pipeta s'ha d'evitar el reflux per no produir contaminacions.
- Quan es manipulen tubs d'agar amb cultius microbians els tubs han de romandre oberts tan poc temps com es pugui. Els taps no poden tocar la superfície de treball, cal agafar-los amb la ma juntament amb la nansa de sembra.
- Quan s'utilitzen medis de cultiu en plaques de Petri, es treballa al costat del bec Bunsen encès i s'obren tan poc temps com es pugui per realitzar les sembres. Deixar les plaques obertes gaire temps és font de contaminacions.
- S'ha de tenir precaució amb la manipulació d'objectes punxants i tallants, que s'han d'eliminar en contenidors especials com el Chemo-Box.

Hàbits d'higiene

- Les superfícies de treball s'han de descontaminar després de la feina diària i després d'un vessament o d'una esquitxada amb material infecciós.
- Els materials contaminats es dipositen en contenidors apropiats que es puguin tancar per al seu trasllat i esterilització posteriors.
- Abans de deixar el laboratori i sempre que sigui necessari s'han de rentar les mans.

Equip de seguretat

Normalment no és necessari.

Instal·lacions

Els laboratoris han de complir les característiques següents:

- Han de ser fàcils de netejar.
- Les superfícies han de ser impermeables a l'aigua, resistents a la calor moderada i als compostos químics.
- Hi ha d'haver un lavabo per poder rentar-se les mans.
- Si les finestres es poden obrir, han de tenir una protecció contra l'entrada d'insectes.

1.6.2. Laboratori de bioseguretat 2 (LBS 2)

Són laboratoris adequats per treballar amb microorganismes que poden produir malalties a l'home i poden representar un perill per als treballadors. Treballar amb aquests microorganismes representa un risc de propagació a la col·lectivitat baixa i generalment se'n coneix la profilaxi i el tractament adequats.

Personal

Per treballar en aquest laboratori és necessària una experiència microbiològica prèvia en la manipulació de microorganismes. La direcció del laboratori és a càrrec d'un professional amb experiència i es controla la salut dels treballadors abans de l'assignació del lloc de treball.

Pràctiques de laboratori

Al LBS 2 es fan servir les pràctiques microbiològiques bàsiques descrites al LBS 1 i a més a més:

- El responsable de seguretat pot restringir l'accés al laboratori quan s'hi treballa. Les persones amb més risc d'adquirir infeccions no hi tenen l'entrada permesa.
- Les portes d'accés al laboratori estan senyalitzades amb el símbol de perill biològic i amb indicadors addicionals com ara la necessitat de vacuna (figura 1.1).



Figura 1.1. Senyal de perill biològic

- Tots els residus s'han de descontaminar abans d'eliminar-los.
- La bata de laboratori s'ha de deixar sempre al laboratori.
- S'ha d'evitar la contaminació a través de la pell. Es recomana portar guants quan es manipuli material infecciós.
- Els vessaments i altres accidents que tinguin com a conseqüència la sobreexposició del personal a material infectat s'han de comunicar al responsable de seguretat.
- S'han de realitzar programes de desinsectació i desratització de la instal·lació.
- No hi pot haver animals no relacionats amb el treball.
- El laboratori ha de disposar d'un manual de bioseguretat.

Equips de seguretat

El treball de laboratori es duu a terme a la lleixa, però es fan servir cabines de seguretat de classe I o II o altres sistemes de protecció personal quan es fan servir tècniques amb un alt risc

de formació d'aerosols, quan s'utilitzen grans volums o quan es fan servir concentracions elevades d'agents infecciosos.

Instal·lacions

- El laboratori ha de disposar d'un autoclau per descontaminar els residus.
- És convenient que la porta d'entrada tingui un espiell o que hi hagi una càmera al laboratori per controlar l'evolució de la feina.

1.6.3. Laboratori de bioseguretat 3 (LBS 3)

És un laboratori on es treballa amb agents biològics del grup 3, és a dir, amb microorganismes que poden produir una malaltia greu a l'ésser humà, que representen un perill seriós per als treballadors i amb un risc de propagació a la col·lectivitat. Normalment hi ha profilaxi i tractament eficaç.

Personal

Només poden treballar en aquest tipus de laboratori persones amb experiència microbiològica prèvia i que reben instrucció específica addicional. El responsable ha de tenir experiència en aquest tipus de microorganismes.

Pràctiques de laboratori

En un LBS 3 es duen a terme les pràctiques de laboratori del nivell 2, però a més a més:

- L'accés hi està restringit durant la feina. Les portes del laboratori han d'estar tancades i senyalitzades amb el símbol de perill biològic.
- El responsable de seguretat controla l'accés del personal de manteniment.
- Totes les activitats amb material infecciosos es fan en cabines de seguretat biològica.
- No es fa servir roba de carrer. S'utilitza roba d'ús exclusiu per al laboratori. Abans de rentar es descontamina.
- És imprescindible l'ús de guants quan es treballa amb animals infectats o quan és impossible evitar el contacte amb material infectat.

Equip de seguretat

Totes les activitats que impliquin la manipulació de material infectat, amb perill de producció d'aerosols, s'han de fer en cabines de seguretat biològica o amb un altre equip de seguretat adient.

Instal·lacions

El disseny d'un LBS 3 es caracteritza per:

- Ser un laboratori separat de la resta del laboratori per una doble porta amb tanca automàtica.

- Tenir pressió d'aire negativa, amb sortida d'aire a l'exterior, mitjançant filtre HEPA i sense recirculació.
- Si hi ha finestres, sempre han d'estar tancades.
- El laboratori ha de disposar d'un lavabo amb aixeta de pedal o automàtica.
- Les preses de buit han d'estar protegides amb filtres HEPA i els sifons s'han de descontaminar.

1.6.4. Laboratori de bioseguretat 4 (LBS 4)

Un LBS 4 és un laboratori dissenyat per treballar amb microorganismes que produeixen una malaltia greu a l'home, que comporta un perill seriós per als treballadors, amb moltes possibilitats que es propagui a la col·lectivitat, i sense que existeixi generalment una profilaxi o un tractament eficaç. Són laboratoris d'alta seguretat amb aïllament total de l'exterior. N'hi ha molt pocs al món. A Espanya només n'hi ha un a Valdemoros, Madrid: el Centro de Investigaciones en Sanidad Animal (CISA).

Personal

Per treballar en aquest laboratori es requereix:

- Personal amb capacitat i específica i completa per manipular agents infecciosos extremadament perillosos, supervisat per científics amb capacitat i experiència per treballar amb aquests agents.
- A aquest laboratori només hi poden accedir persones expressament autoritzades. L'entrada al laboratori ha de tenir mesures de seguretat addicionals

Pràctiques de laboratori

- La porta del laboratori ha d'estar senyalitzada amb el símbol de perill biològic, i s'hi ha d'indicar el nom del microorganisme que es manipula, el nom del responsable de bioseguretat i si és necessari fer servir equips de seguretat addicionals.
- Tot el material, abans de sortir del laboratori, s'ha d'esterilitzar en una autoclau de doble porta. La porta externa només s'obrirà quan s'hagi acabat el cicle d'esterilització.
- Els materials que s'hagin de transportar fora del laboratori aniran dins d'un contenidor irrompible, que anirà, a la vegada, dins d'un segon contenidor hermètic i de fàcil descontaminació. Per permetre'n la sortida, s'haurà de passar per un producte descontaminant (figura 1.2).

Equip de seguretat

- Totes les manipulacions que es duiguin a terme al laboratori s'han de fer en cabines de classe III o classe II i el treballador ha de portar un vestit hermètic amb pressió negativa i respiració assistida. Abans d'abandonar la zona s'haurà de descontaminar el vestit amb una dutxa química.
- El subministrament de materials s'ha de fer a través d'una autoclau de doble porta o d'una cambra de descontaminació superficial.

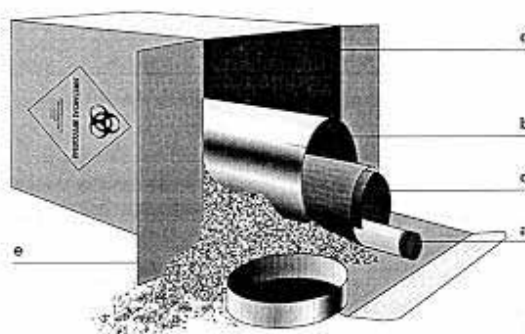


Figura 1.2. Embalatge en tres capes per a sortida de material biològic de LBS 4.

Instal·lacions

- El laboratori es troba separat de tota activitat que es desenvolupi en el mateix edifici o en una instal·lació independent.
- El personal que entri en el laboratori només pot sortir-ne a través d'un vestuari amb dutxa. Cada vegada que surti del laboratori s'haurà de dutxar.
- La roba de carrer es deixa al vestuari i se'n fa servir una d'ús exclusiu del LBS 4. A la sortida, la roba de laboratori s'introdueix en un recipient i es descontamina abans de portar-la a l'exterior.
- Les parets, els sostres i el sòl estan segellats per facilitar la descontaminació i evitar l'entrada d'insectes. Tots els desguassos estan connectats amb sistemes de descontaminació. L'aire ha de sortir a través de filtres HEPA.

1.7. Bibliografia

Anon. *Normes generals d'actuació en els laboratoris docents de la Facultat de Farmàcia*. Unitat de Laboratoris Docents (ULD). Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

NTP 376: *Exposición a agentes biológicos: seguridad y buenas prácticas de laboratorio*. Ministeri de Treball i Afers Socials. Institut Nacional de Seguretat i Higiene en el Treball.

Reial decret 664/1997, de 12 de maig (BOE núm. 124, de 24 de maig). *Guia tècnica per a l'avaluació i la prevenció dels riscos relacionats amb l'exposició a agents biològics*. Ministeri de Treball i Afers Socials. Institut Nacional de Seguretat i Higiene en el Treball.