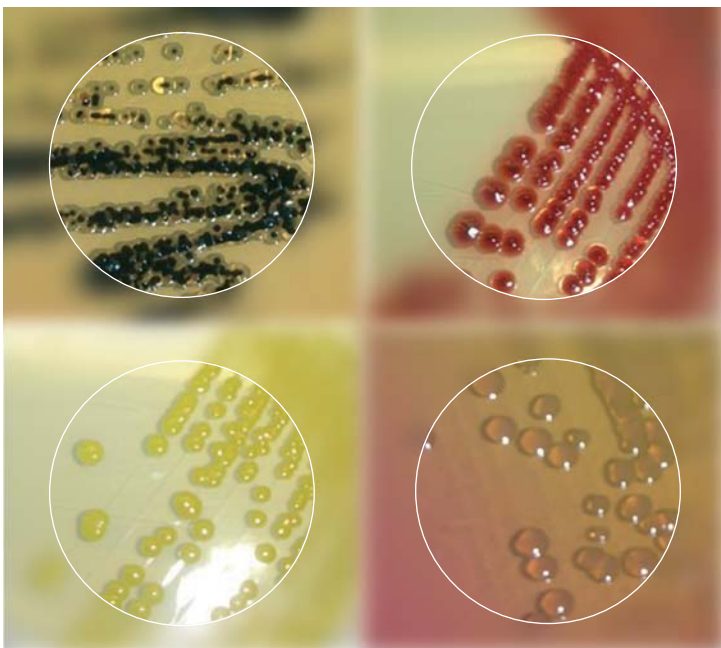


ANÀLISI MICROBIOLÒGICA I HIGIENE DELS ALIMENTS

Núria Rius Bofill (coordinació)
Núria Rius Bofill
Mercedes Berlanga Herranz
Ana M. Marqués Villavecchia



ANÀLISI MICROBIOLÒGICA I HIGIENE DELS ALIMENTS

Núria Rius Bofill (coordinació)

Núria Rius Bofill

Mercedes Berlanga Herranz

Ana M. Marqués Villavecchia

INTRODUCCIÓ

Els aliments que consumeix l'home són principalment d'origen vegetal i animal. Coneixent els microorganismes que acompanyen els aliments en el seu estat natural i les manipulacions a les quals seran sotmesos es pot predir quins microorganismes hi haurà en un determinat producte alimentari després de la seva elaboració.

Molts aliments s'obtenen gràcies a l'acció controlada de determinats microorganismes. En alguns casos en són contaminants naturals i en d'altres són afegits expressament durant la seva fabricació o producció. Ara bé, els microorganismes també juguen un paper important en l'alteració dels aliments. La contaminació microbiana d'un aliment pot tenir conseqüències més o menys greus; des de la pèrdua de les seves característiques organolèptiques fins a la producció en el consumidor d'intoxicacions i toxoinfeccions greus i inclús la mort.

La contaminació microbiana dependrà dels següents factors: (1) origen de les primeres matèries; (2) la seva qualitat microbiològica en estat fresc o no elaborat; (3) condicions sanitàries durant la manipulació i elaboració del producte; i (4) condicions d'envasament, transport i emmagatzematge del producte acabat.

Els microorganismes poden arribar als aliments per diferents vies:

- Per les mans brutes de les persones que els manipulen.
- Per l'aire, bé en forma de petites gotes que s'expulsen per la boca i el nas en parlar, però sobretot en tossir o esternudar.
- Per contacte amb utensilis mal rentats o amb d'altres aliments contaminats.
- Per aigua contaminada amb la qual s'han rentat els aliments que es mengen crus o que s'ha emprat per regar-los.
- Per insectes, especialment les mosques i els escarabats de cuina.
- Pels pinsos, que constitueixen una font important de *Salmonella* i *Listeria monocytogenes*.
- Per la pròpia microbiota que forma part d'alguns aliments conspicus (formatges, embotits, etc.)

La presència de certs microorganismes en els aliments pot donar lloc a diverses malalties en l'home que s'enquadren en dos grups generals: les intoxicacions i les infeccions. Es considera **intoxicació** quan el microorganisme responsable es multiplica en l'aliment, produint una toxina que en ser ingerida provoca la malaltia. En el cas de la **infecció**, el microorganisme causal es troba a l'aliment i en ser consumit amb ell origina un procés patològic determinat. En alguns casos tenen lloc els dos efectes alhora.

De tot el que ha estat exposat podem deduir que els microorganismes d'importància alimentària són aquells que són presents de forma natural a l'aliment, els que hi han estat afegits de manera intencionada durant la seva elaboració i els que el contaminen. Evidentment, els aliments contenen un nombre variable de bacteris, floridures i llevats, i sovint ens preguntem si un determinat aliment és innoce fixant-nos en el nombre

total de microorganismes. La pregunta és doble: Quin és el nombre total de microorganismes presents per gram o mil·lilitre? I, quins tipus de microorganismes estan presents en aquest nombre?. En el cas d'alguns microorganismes, per exemple *Salmonella*, n'hi ha prou amb la seva presència en una quantitat determinada d'aliment, perquè aquest sigui considerat **no apte per al consum públic**.

Aquest llibre recull els protocols experimentals d'anàlisi microbiològica d'aliments i dels controls microbiològics relacionats amb la Higiene dels Aliments. El llibre s'ha estructurat en els onze capítols següents :

- I. Seguretat en el laboratori.
- II. Obtenció i preparació de les mostres.
- III. Metodologia per a la anàlisi microbiològica d'aliments.
- IV. Criteris microbiològics significatius per a aliments.
- V. Control microbiològic de superfícies.
- VI. Control microbiològic de l'aire.
- VII. Manipuladors d'aliments.
- VIII. Valoració microbiològica dels desinfectants.
- IX. Sensibilitat dels microorganismes als desinfectants.
- X. Medis de cultiu, solucions i colorants.
- XI. Esterilització.

El capítol I tracta de les mesures de seguretat **imprescindibles** en un laboratori de microbiologia.

En el capítol II s'explica com preparar les mostres d'aliment. El capítol III consta de 24 apartats on es descriuen els mètodes analítics per al recompte i investigació dels microorganismes o grups de microorganismes més importants que es poden trobar en els aliments. La redacció de l'informe final s'explica al capítol IV. Aquest capítol també recull els criteris microbiològics de menjars preparats i d'alguns aliments.

Els capítols del V al IX descriuen els protocols experimentals relacionats amb els aspectes microbiològics de la Higiene dels Aliments.

El capítol X fa referència a la preparació de medis de cultiu, solucions, reactius i colorants. També inclou els protocols de les tincions simples i diferencials. El darrer és una revisió de les diferents tècniques d'esterilització emprades en microbiologia.

L'edició electrònica del llibre conté un capítol annex amb fotografies en color de cultius, de proves bioquímiques de confirmació d'alguns dels microorganismes descrits en els capítols III i VII, i de cultius obtinguts en el control microbiològic de superfícies i d'aire, i en la valoració microbiològica de desinfectants.

ÍNDEX

CAPÍTOL I

1. Seguretat en el laboratori	1
1.1. Formes d'exposició	1
1.2. Avaluació del risc	2
1.2.1. <i>Nivells de seguretat recomanats segons els agents infecciosos</i>	2
1.3. Principis de bioseguretat	2
1.3.1. <i>Tècniques i pràctiques de laboratori</i>	3
1.3.2. <i>Equip de seguretat</i>	3
1.3.3. <i>Disseny de l'edifici</i>	4
1.4. Nivells de seguretat	4
1.4.1. <i>Pràctiques microbiològiques en un laboratori de bioseguretat 1 (LBS 1)</i>	4
1.4.2. <i>Laboratori de bioseguretat 2 (LBS 2)</i>	8
1.4.3. <i>Laboratori de bioseguretat 3 (LBS 3)</i>	9
1.4.4. <i>Laboratori de bioseguretat 4 (LBS 4)</i>	9
1.5. Bibliografia	10

CAPÍTOL II

2. Obtenció i preparació de les mostres	11
2.1. Mostratge	11
2.1.1. <i>Nombre de mostres</i>	11
2.1.2. <i>Mostratge aleatori</i>	11
2.1.3. <i>Condicions per al mostratge</i>	12
2.2. Preparació de les mostres	15
2.2.1. <i>Material</i>	15
2.2.2. <i>Procediment operatiu</i>	15
2.3. Preparació de les dilucions decimals o banc de dilucions	16
2.3.1. <i>Material</i>	16
2.3.2. <i>Procediment operatiu</i>	16
2.4. Bibliografia	17

CAPÍTOL III

3. Metodologia per a la anàlisi microbiològica d'aliments	19
3.1. Recompte de bacteris aerobis mesòfils	19
3.1.1. <i>Sembra en profunditat</i>	19
3.1.2. <i>Sembra per superfície</i>	22
3.1.3. <i>Mètode de les gotetes d'agar</i>	22
3.2. Recompte, aïllament i identificació de fongs	23
3.2.1. <i>Recompte de fongs</i>	23
3.2.2. <i>Aïllament de floridures i llevats</i>	24
3.2.3. <i>Identificació de les floridures</i>	25

3.2.4. Identificació dels llevats	30
3.3. Recompte d'Enterobacteriaceae totals	32
3.3.1. Sembra per superfície	32
3.3.2. Sembra en profunditat pel mètode de la doble capa d'agar	33
3.3.3. Resultats	33
3.4. Investigació d'Enterobacteriaceae.....	34
3.4.1. Enriquiment en medi líquid selectiu	35
3.4.2. Aïllament en medi sòlid selectiu	35
3.4.3. Comprovació de les colònies	36
3.4.4. Resultats	36
3.5. Recompte d'Enterobacteriaceae lactosapositives	36
3.5.1. Sembra per superfície.....	36
3.5.2. Mètode de filtració per membrana	37
3.6. Recompte de coliformes totals: valoració pel nombre més probable	38
3.6.1. Material	39
3.6.2. Procediment operatiu.....	39
3.6.3. Resultats	40
3.7. Recompte d'Escherichia coli	42
3.7.1. Material	42
3.7.2. Procediment operatiu	42
3.7.3. Resultats	42
3.8. Investigació d'Escherichia coli	46
3.8.1. Prova ràpida per al recompte i la investigació d'Escherichia coli	46
3.8.2. Proves ràpides per a la identificació de soques patògenes d'Escherichia coli	47
3.9. Sistema ràpid d'identificació de les enterobacteriàcies.....	48
3.9.1. Material	48
3.9.2. Procediment operatiu	49
3.9.3. Resultats	49
3.9.4. Proves complementàries: reducció de nitrats	51
3.9.5. Proves addicionals	52
3.10. Investigació de Salmonella	55
3.10.1. Pre-enriquiment en medi líquid no selectiu	56
3.10.2. Enriquiment en medis líquids selectius	56
3.10.3. Aïllament en medis sòlids diferencials	58
3.10.4. Confirmació bioquímica	59
3.10.5. Confirmació serològica: aglutinació en porta	63
3.10.6. Proves ràpides per a la investigació de Salmonella.....	66
3.11. Investigació de Shigella	67
3.11.1. Enriquiment en medis líquids selectius	67
3.11.2. Aïllament diferencial en medis sòlids selectius	68
3.11.3. Confirmació bioquímica	69
3.11.4. Confirmació serològica: aglutinació en porta	69
3.12. Recompte d'Staphylococcus	70
3.12.1. Material	71
3.12.2. Procediment operatiu	71
3.12.3. Resultats	71
3.13. Investigació d'Staphylococcus aureus	73

3.13.1. Enriquiment en medi líquid no selectiu	74
3.13.2. Aïllament en medi sòlid selectiu	74
3.14. Recompte de <i>Clostridium perfringens</i>	75
3.14.1. Regeneració dels medis de cultiu	75
3.14.2. Cultiu en anaerobiosi. Sistema d'anaerobiosi GasPak®	75
3.14.3. Tècnica per a l'enumeració en medi líquid	76
3.14.4. Tècnica per a l'enumeració en medi sòlid. Mètode de recompte en tubs	77
3.15. Recompte de <i>Clostridium sulfitoreductors</i>	78
3.15.1. Material	78
3.15.2. Procediment operatiu	78
3.15.3. Resultats	78
3.16. Recompte d'espores de <i>Clostridium sulfitoreductors</i>	79
3.17. Recompte d' <i>Enterococcus</i>	79
3.17.1. Valoració pel nombre més probable	79
3.17.2. Mètode de filtració per membrana.....	81
3.17.3. Proves addicionals	82
3.18. Investigació de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	83
3.18.1. Enriquiment en medi líquid selectiu	84
3.18.2. Aïllament diferencial en medi sòlid selectiu	84
3.18.3. Proves confirmatives	85
3.19. Recompte de <i>Bacillus cereus</i>	89
3.19.1. Tècnica del recompte en placa	89
3.19.2. Valoració pel nombre més probable	90
3.19.3. Proves confirmatives	91
3.20. Investigació de <i>Bacillus cereus</i>	93
3.20.1. Enriquiment en medi líquid selectiu	93
3.20.2. Aïllament en medi sòlid selectiu.....	93
3.21. Recompte de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94
3.21.1. Material	94
3.21.2. Procediment operatiu	94
3.21.3. Resultats	94
3.21.4. Proves confirmatives	95
3.22. Investigació de <i>Listeria monocytogenes</i>	97
3.22.1. Pre-enriquiment en medi líquid no selectiu	97
3.22.2. Enriquiment en medi líquid selectiu	98
3.22.3. Aïllament diferencial en medis sòlids selectius	98
3.22.4. Confirmació bioquímica	99
3.22.5. Proves ràpides per a la detecció de <i>Listeria monocytogenes</i>	103
3.23. Recompte de <i>Listeria monocytogenes</i>	103
3.23.1. Material	103
3.23.2. Procediment operatiu	103
3.23.3. Resultats	103
3.23.4. Proves confirmatives	104
3.24. Bibliografia	104
CAPÍTOL IV	
4. Criteris microbiològics significatius per a aliments	105
4.1. Definicions	105
4.2. Selecció dels criteris microbiològics	106

4.3. Normes microbiològiques de menjars preparats	106
4.3.1. Normes microbiològiques dels menjars preparats del grup A	106
4.3.2. Normes microbiològiques dels menjars preparats del grup B	107
4.3.3. Normes microbiològiques dels menjars preparats del grup C	108
4.3.4. Normes microbiològiques dels menjars preparats del grup D	108
4.3.5. Criteris per a la valoració dels resultats de les anàlisi	108
4.4. Protocol d'anàlisi microbiològica d'aliments	109
4.4.1. Carn picada	109
4.4.2. Musclos	110
4.4.3. Patates fregides i productes d'aperitiu	111
4.4.4. Beguda refrescant no alcohòlica	112
4.4.5. Galetes	113
4.4.6. Aigües minerals naturals	114
4.4.7. Gelats	115
4.5. Redacció d'informes	116
4.5.1. Exemple 1	117
4.5.2. Exemple 2	119
4.6. Bibliografia	121
CAPÍTOL V	
5. Control microbiològic de superfícies	123
5.1. Mètode del bastonet esbandit	123
5.1.1. Material	123
5.1.2. Procediment operatiu	124
5.1.3. Resultats	124
5.2. Mètode de la placa de contacte (placa RODAC)	125
5.2.1. Material	125
5.2.2. Procediment operatiu	125
5.2.3. Resultats	125
5.3 Sistema Hygicult ®	126
5.2.1. Material	126
5.2.2. Procediment operatiu	126
5.2.3. Resultats	127
5.4. Bibliografia	128
CAPÍTOL VI	
6. Control microbiològic de l'aire	131
6.1. Obtenció de mostres d'aire	131
6.1.1. Mètode de sedimentació	131
6.1.2. Aerocentrífugues (col·lectors d'impacte)	131
6.1.3. Mètode de xoc en líquid o borbolladors	132
6.2. Elecció del sistema de mostratge	132
6.3. Recompte de bacteris aerobis mesòfils pel mètode de sedimentació	132
6.3.1. Material	132
6.3.2. Procediment operatiu	132
6.3.3. Resultats	133
6.4. Recompte de bacteris aerobis mesòfils amb aerocentrífuga	133
6.4.1. Material	133
6.4.2. Procediment operatiu	133

6.4.3. Resultats	134
6.5. Bibliografia	135
CAPÍTOL VII	
7. Manipuladors d'aliments	137
7.1. Contaminació d'aliments per manipulació	137
7.2. Contaminació	137
7.2.1. Contaminació des del tracte digestiu	137
7.2.2. Contaminació per via cutània	138
7.2.3. Contaminació per via respiratòria	138
7.3. Requisits dels manipuladors d'aliments: «Real Decreto 202/2000, 11 de febrero»	138
7.4. Higiene personal	139
7.4.1. Control microbiològic de les mans	139
7.5. Anàlisi de portadors d' <i>Staphylococcus aureus</i> a la mucosa nasal	140
7.5.1. Enriquiment en medi líquid no selectiu	140
7.5.2. Aïllament en medi sòlid selectiu	141
7.5.3. Confirmació de les colònies	141
7.6. Bibliografia	142
CAPÍTOL VIII	
8. Valoració microbiològica dels desinfectants	143
8.1. Valoració d'un desinfectant segons les normes AFNOR	144
8.1.1. Material	144
8.1.2. Procediment operatiu	144
8.1.3. Resultats	148
8.2. Coeficient de fenol	148
8.3. Bibliografia	149
CAPÍTOL IX	
9. Sensibilitat dels microorganismes als desinfectants	151
9.1. Mètode de difusió en agar	151
9.1.1. Material	152
9.1.2. Procediment operatiu	152
9.1.3. Resultats	153
9.2. Bibliografia	153
CAPÍTOL X	
10. Medis de cultiu, solucions i colorants	155
10.1. Medis de cultiu	155
10.1.1. Tipus de medis de cultiu	155
10.2. Preparació dels medis de cultiu	156
10.3. Control dels medis de cultiu	157
10.4. Medis de cultiu no comercials	157
10.4.1. Aigua de triptona amb sal (TW)	157
10.4.2. Aigua de triptona mb 3% de NaCl (TW 3%)	157
10.4.3. Agar per a anaerobis sense glucosa ni indicador	157
10.4.4. Agar nutritiu amb 3% de NaCl (TSA 3%)	158
10.4.5. Agar triptona de soja amb extracte de llevat (TSA-YE)	158
10.4.6. Agar triptona sulfit neomicina (TSN)	158
10.4.7. Brou lactosa sulfit (CLS)	158
10.4.8. Brou lisina descarboxilasa amb 3% de NaCl (LIB 3%)	159
10.4.9. Brou per a <i>Listeria</i> LEB 1	159

10.4.10. Brou per a <i>Listeria</i> LEB 2	160
10.4.11. Brou nitrats	160
10.4.12. Brou púrpura de bromocresol amb ramnosa	161
10.4.13. Brou púrpura de bromocresol amb xilosa	161
10.4.14. Brou sal polimixina (CSP)	162
10.4.15. Brou triptona de soja amb extracte de llevat (TSB-YE)	162
10.4.16. Brou tripticasa de soja polimixina	162
10.5. Solucions salines	162
10.5.1. Ringer ¼	163
10.5.2. Ringer ¼ amb cisteïna	163
10.6. Reactius	163
10.6.1. Reactiu per al TDA	163
10.6.2. Reactiu de Barrit	163
10.6.3. Reactiu de Griess	163
10.6.4. Reactiu per a la catalasa	164
10.6.5. Reactiu de Kovacs	164
10.6.6. Reactiu de l'oxidasa	164
10.7. Tincions	164
10.7.1. Tincions simples	164
10.7.2. Tincions diferencials	165
10.8. Colorants	167
10.8.1. Blau de lactofenol	167
10.8.2. Cristall violeta (modificació de Hucker)	167
10.8.3. Fucsina diluïda	167
10.8.4. Lugol	168
10.8.5. Negre Sudan	168
10.8.6. Safranina	168
10.8.7. Verd malaquita	168
10.9. Bibliografia	169
CAPÍTOL XI	
11. Esterilització	171
11.1. Esterilització física	171
11.1.1. Esterilització per calor humida	171
11.1.2. Esterilització per calor seca	172
11.1.3. Incineració	173
11.1.4. Esterilització per filtració	174
11.1.5. Esterilització per radiació	175
11.2. Esterilització química	175
11.2.1. Òxid d'etilè	175
11.2.2. β -propiolactona	176
11.2.3. Glutaraldehyd	176
11.2.4. Formaldehyd	176
11.3. Preparació del material a utilitzar	176
11.4. Bibliografia	177

CAPÍTOL I

1. SEGURETAT EN EL LABORATORI

Els laboratoris microbiològics constitueixen un ambient de treball especial, generalment únic, perquè s'hi manipulen microorganismes patògens o potencialment patògens. Una de les conseqüències desafortunades de treballar amb material infecciós és la possibilitat d'adquirir una infecció associada al laboratori (IAL). La història ens demostra que aquestes infeccions es presenten i que les persones que treballen en un laboratori tenen un risc més gran d'infecció per alguns dels agents amb els quals treballen que la població en general. Tot i això, no s'ha demostrat que els laboratoris on es treballa amb agents infecciosos representin una amenaça per a la comunitat.

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 d'higiene es treballarà amb microorganismes patògens i, per tant, se suposa que els estudiants tindran unes aptituds i unes actituds que els permetran treballar en un laboratori de microbiologia de bioseguretat de nivell 2 (ap. 1.4.2). D'altra banda, **és obligatori llegir aquest capítol** abans de començar les pràctiques, per tal de conèixer i assumir quines són les normes de seguretat necessàries en funció dels possibles microorganismes que s'aïllin en les mostres.

1.1. Formes d'exposició

En un laboratori de microbiologia, les persones poden entrar en contacte amb els microorganismes de quatre maneres 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.) o 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 de contaminació. 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 hipodèrmiques o amb objectes punyents i l'aspiració del contingut d'una pipeta.

1.2. Avaluació del risc

El concepte de *risc* implica la probabilitat que es produeixi un mal, una lesió o una malaltia. En un laboratori de microbiologia l'avaluació del risc es concentra principalment en la prevenció de malalties de laboratori. L'avaluació del risc és un exercici crític i fonamental, ja que permet establir la manera segura de treballar. Per tal d'avaluar el risc d'infecció que representa el fet de treballar amb un determinat microorganisme o una determinada mostra, s'han de tenir presents diferents fets, com ara la patogenicitat de l'agent infecciós, la ruta de transmissió, la dosi infecciosa i l'estat immunològic del treballador, la concentració i el volum de microorganismes amb què es treballa i si hi ha o no una profilaxi o teràpia eficaç.

No sempre se sap quins agents infecciosos hi ha a les mostres que arriben al laboratori. En aquest cas, que és molt freqüent, és un repte establir el nivell de seguretat adequat. S'ha de treballar amb suposicions i es recomana ser prudent, treballant amb un nivell de seguretat alt.

1.2.1. Nivells de bioseguretat recomanats segons els agents infecciosos

En la taula 1.1 es presenten els microorganismes més importants en microbiologia dels aliments i que són un perill provat per al personal del laboratori. La classificació segueix els criteris de la *Guia tècnica per a l'avaluació i prevenció dels riscos relacionats amb l'exposició a agents biològics* (Reial decret 664/1997, de 12 de maig; BOE núm.124, de 24 de maig). L'avaluació del risc i els nivells de bioseguretat recomanats en la taula pressuposen una població d'individus adults sans.

1.3. Principis de bioseguretat

El terme *barrera* es fa servir per descriure els mètodes segurs que cal fer servir per manipular agents infecciosos en el laboratori durant el treball diari. El propòsit de la contenció és reduir o eliminar l'exposició dels treballadors del laboratori i de les persones que es troben a l'exterior als agents potencialment perillosos.

La finalitat de les barreres primàries és protegir el personal i l'ambient pròxim del laboratori de l'exposició als agents infecciosos. Això s'aconsegueix amb bones tècniques microbiològiques i fent servir aparells amb una seguretat adequada. L'ús de vacunes pot incrementar el nivell de protecció personal.

Les barreres secundàries pretenen protegir el medi ambient de l'exposició a materials infecciosos. Això es pot aconseguir amb una combinació del disseny de l'edifici i de determinades pràctiques de treball. El coneixement del tipus de risc que representa manipular un determinat agent determinarà la combinació adequada dels elements de seguretat esmentats.

<i>Agent</i>	<i>Nivell de risc</i>	<i>Transmissió</i>	<i>Nivell de seguretat</i>	<i>Vacuna</i>
<i>Brucella melitensis</i> <i>B. abortus</i> <i>B. suis</i> , <i>B. canis</i>	Infecció de laboratori més informada. Risc elevat.	Aspiració, contacte amb la pell, inhalació, via parenteral	*LBS 3	No disponible
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. fetus</i> subesp. <i>fetus</i>	Poc freqüent. Freqüent en cuidadors d'animals	Ingestió Via parenteral	LBS 2	No disponible
<i>Clostridium botulinum</i>	Incidència baixa. Conseqüències greus. Bioterrorisme	Exposició a la toxina: ingestió, contacte amb la pell	LBS 2	Toxoide botulínic (ABCDE)
<i>E. coli</i> entero-hemorràgica (EHEC)	Risc provat	Ingestió	LBS 3	No disponible
<i>Listeria monocytogenes</i>	Risc especial per a les embarassades	Ingestió	LBS 2 (amb guants i ulleres)	No disponible
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Risc elevat	Inhalació	LBS 3	Vacuna BCG
<i>Salmonella</i> (excepte el serotip Typhi)	Risc provat	Ingestió, inoculació parenteral	LBS 2	No disponible
<i>Salmonella</i> Typhi	Risc provat	Ingestió, inoculació parenteral	LBS 3	Sí
<i>Shigella</i> sp. <i>S. dysenteriae</i> tipus 1	Risc provat	Ingestió, inoculació parenteral	LBS 2 i LSB 3, respectivament	No disponible
<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	Molt poc freqüent	Ingestió	LBS 2	Sí
Virus de les hepatitis A i E	Molt poc freqüent	Ingestió	LBS 2 i LSB 3, respectivament	Sí per al virus de l'hepatitis A

*LBS: laboratori de bioseguretat

TAULA 1.1. Nivell de seguretat recomanat per treballar amb diferents microorganismes

1.3.1. Tècniques i pràctiques de laboratori

Per poder treballar amb material potencialment infecciós, les persones han de conèixer els riscos que això representa, tenir experiència en aquest camp i dominar les pràctiques necessàries per manipular el material esmentat. El director és el responsable que el personal adquireixi experiència. Cada laboratori ha d'elaborar un manual de bioseguretat on s'identifiquin els riscos possibles i s'especifiquin les pràctiques i els procediments dissenyats per eliminar o reduir els riscos al màxim. El personal ha de conèixer aquesta informació i n'ha de seguir la pràctica.

1.3.2. Equip de seguretat

Les cabines de seguretat biològica són aparells que s'utilitzen generalment per conferir protecció (contenció) contra les esquitxades o els aerosols infecciosos generats per alguns procediments emprats en microbiologia. Hi ha tres tipus de cabines de seguretat:

- Cabines de **classe I**, amb frontal obert: formen una barrera que ofereix un bon nivell de protecció al personal del laboratori i a l'ambient quan les tècniques microbiològiques es realitzen bé.
- Cabines de **classe II**, amb flux d'aire laminar: endemés, protegeixen la mostra de la contaminació externa.
- Cabines de **classe III**, hermètiques als gasos: presenten el nivell de protecció més alt.

La centrifugació de mostres amb microorganismes també pot generar aerosols. Per tal d'evitar aquest perill es poden fer servir recipients de centrífuga de seguretat, que tanquen hermèticament i són resistents al trencament.

L'equip de seguretat també inclou articles per a la protecció individual (EPI), com ara bates, guants, davantals, mascaretes i ulleres de seguretat. Ambdós sistemes de protecció es fan servir de manera combinada.

1.3.3. Disseny de l'edifici

El disseny de l'edifici és molt important, perquè aquest fa de barrera protectora tant per a les persones que treballen en el mateix edifici però fora del laboratori com per a les persones que es troben a l'exterior, ja que evita que els agents infecciosos es vessin de manera accidental a l'exterior del laboratori. Les barreres secundàries recomanades depenen del risc de transmissió dels agents específics. A mesura que s'incrementa el risc de transmissió per aerosols, és necessari incrementar les barreres primàries i també les secundàries, per tal d'evitar que els agents infecciosos s'escapin al medi ambient. Això inclou sistemes de ventilació especialitzada per assegurar el flux direccional de l'aire, sistemes de tractament de l'aire per descontaminar o eliminar els agents a la sortida de l'aire, accés controlat de la zona, pressió d'aire interna negativa i doble porta d'entrada. Per assolir el nivell més alt de seguretat, el laboratori ha d'estar en un edifici separat.

1.4. Nivells de seguretat

Hi ha quatre nivells de bioseguretat descrits, que s'aconsegueixen modificant les tècniques i les pràctiques de laboratori, el tipus d'equipament que es fa servir i la infraestructura que posseeix el laboratori, depenent de la sospita de la via de transmissió dels agents infecciosos amb els quals es treballa. En la taula 1.2 hi ha un resum dels procediments recomanats en cada nivell de bioseguretat.

1.4.1. Pràctiques microbiològiques en un laboratori de bioseguretat 1 (LBS 1)

El laboratori de bioseguretat 1 és un laboratori de docència, adequat perquè els alumnes s'iniciïn en les tècniques bàsiques de la microbiologia. S'hi treballa amb microorganismes ben caracteritzats, que no produeixen malalties en adults sans i amb un mínim de risc per al personal del laboratori i per a l'ambient. Aquest laboratori té els nivells bàsics de contenció necessaris per a les pràctiques microbiològiques bàsiques. No cal que hi hagin barreres primàries o secundàries especials.

<i>LBS</i>	<i>Agents</i>	<i>Pràctiques</i>	<i>Equips de seguretat (barreres primàries)</i>	<i>Instal·lacions (barreres secundàries)</i>
1	No produeixen malalties en adults sans	Pràctiques bàsiques de microbiologia	No se n'exigeix cap	Lavabo disponible
2	Associats amb malalties en humans. Risc: inoculació percutània, ingestió, exposició de membranes mucoses	Pràctiques de LBS 1 més: • Accés restringit • Senyals de risc biològic • Alerta amb objectes punyents • Manual de bioseguretat	Cabines de seguretat biològica (CSB) tipus I o II o altres sistemes de seguretat sempre que es formin aerosols. Equip protector individual (EPI): bata. Guants i mascareta quan sigui necessari	LBS 1 més: • autoclau disponible
3	Agents indígenes o exòtics amb potencial de transmissió per aerosols; poden produir malalties greus o amb conseqüències fatals	Pràctiques de LBS 2 més: • Accés controlat • Descontaminació de tots els residus • Descontaminació de la roba de laboratori abans de rentar • Control serològic	CSB tipus I o II o altres sistemes de contenció per a totes les manipulacions amb agents. EPI: bata de laboratori protectora, guants i mascareta	LBS 2 més: • separació física dels passadissos d'accés • accés amb doble porta i tanca automàtica • no-recirculació de l'aire • pressió d'aire interna negativa
4	Agents perillosos o exòtics amb un alt risc de produir malalties greus; infeccions transmeses per aerosols; agents amb risc de transmissió desconegut	Pràctiques de LBS 3 més: • Canvi de roba abans d'entrar • Dutxa a la sortida • Descontaminació de tot el material a la sortida de la instal·lació	Tots els procediments es realitzen en CSB tipus III o tipus II més vestit hermètic amb pressió positiva	LBS 3 més: • edifici separat o zona aïllada • sistema de descontaminació per a tots els residus: aigües, aire i buit

TAULA 1.2. Resum dels nivells de bioseguretat recomanats segons els agents infecciosos

1.4.1.1. Pràctiques de laboratori bàsiques**Per realitzar les pràctiques de microbiologia es necessita:**

- bata blanca
- ulleres de seguretat
- retolador de vidre per marcar els tubs i les plaques emprades
- llumins o encenedor per al bec Bunsen
- llibre de pràctiques

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 conèixer la situació dels següents elements de seguretat:

- Sortides del laboratori i sortides d'emergència
- Extintors, mànegues i mantes contra incendis
- Farmacioles, dutxes d'emergència, rentaüls i armaris de seguretat
- Informació sobre què cal fer en cas d'emergència (mireu les instruccions al tauler d'anuncis de suro)
- Pla d'emergència

Condicions de l'àrea de treball

- L'àrea de treball s'ha de mantenir neta i endreçada.
- No es poden deixar objectes personals (llibres, abrics, bosses, etc.) damunt de les taules de treball. S'han de deixar a les taquilles que hi ha al laboratori o al passadís.
- Si es vessa un producte, s'ha de recollir immediatament, prenent sempre les mesures de seguretat pertinents.

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

- La bata és d'ús obligatori i s'ha de portar sempre cordada.
- Les ulleres de seguretat homologades segons la normativa de la UE (amb protecció contra impactes o esquitxos frontals o perifèrics) són d'ús obligatori. S'han de fer servir 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.
- No es poden dur mai lents de contacte, ja que, en cas d'accident, els productes químics, ja sigui en estat líquid (esquitxades), 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 al laboratori

- No s'hi pot fumar, menjar, beure o mastegar xiclet.
- No es poden guardar aliments ni begudes a les neveres i/o als congeladors del laboratori.
- No es pot tastar ni tocar amb les mans cap producte químic o biològic.
- S'han de dur els cabells llargs recollits.
- S'aconsella no portar faldilles, pantalons curts, mitges ni sandàlies.
- No es poden portar braçalets, penjolls, mànigues amples, etc., que puguin enganxar-se.

Manipulació de productes químics

- No s'ha de pipetejar mai amb la boca. S'han d'emprar sempre els dispositius que tenen aquesta finalitat.
- No es poden portar tubs d'assaig ni productes a les butxaques.

- La manipulació de qualsevol producte que pugui desprendre vapors tòxics, corrosius, irritants o lacrimògens ha de fer-se sempre a les vitrines extractores de gasos.
- Si es manipulen productes tòxics o corrosius, s'han d'emprar els guants adequats per a cada cas.
- A l'hora d'examinar les olors, no s'ha de fer mai directament. S'ha d'arrossegar amb la mà i cap al nas una porció del vapor que es vol ensumar.
- No s'ha d'escalfar mai res en recipients totalment tancats. Cal dirigir l'obertura del recipient cap a la direcció contrària a un mateix i a la d'altres persones properes.
- Quan un producte bulli, s'han d'introduir dins del recipient, si és possible, boles de vidre o de porcellana porosa per tal d'evitar les esquixades.
- Si el líquid és inflamable, no s'ha d'escalfar mai a la flama.
- Tots els productes que s'han d'utilitzar han d'estar etiquetats correctament.
- Abans d'utilitzar un reactiu determinat, cal llegir-ne amb atenció l'etiqueta i assegurar-se bé que no s'empra un producte per un altre.
- Cal etiquetar degudament les solucions preparades al laboratori.

Manipulació de productes microbiològics

- **L'accés al laboratori és limitat durant el cultiu i la manipulació de les mostres.**
- Cal rentar-se les mans després de realitzar un experiment, manipular material viable i treure's els guants, i abans de sortir del laboratori.
- No s'ha de pipetejar mai amb la boca. S'han d'emprar sempre els dispositius existents amb aquesta finalitat.
- Cal fer amb cura tots els procediments per tal de minimitzar la formació d'esquixades o aerosols.
- En cas de patir un accident, com ara talls o cremades, cal comunicar-ho al/s professor/s de pràctiques.
- Les superfícies de treball s'han de descontaminar almenys una vegada al dia i després de cada vessament de material viable.

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 (contenidor de plàstic blau)
- Vidre net (contenidor de plàstic verd)
- Plàstic (contenidor de plàstic groc)

Material contaminat:

- Chemo-Box (contenidor de plàstic dur groc): per a material punyent, com ara puntes de pipeta i xeringues
- Bidons blaus: per a qualsevol tipus de material contaminant, com ara vidre, guants, paper de filtre, etc.
- 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)

Pel que fa als **cultius i residus contaminats** generats al laboratori, abans d'eliminar-los o de rentar-los, s'han de descontaminar seguint el mètode adequat, com per exemple l'esterilització en una autoclau.

En qualsevol altre cas, consulteu el manual de residus.

No es permet emportar-se material o cultius del laboratori.

1.4.1.2. Equipament de laboratori (barreres primàries)

Normalment, per manipular els microorganismes associats amb aquest nivell no es requereix cap protecció especial. La bata blanca és d'ús obligatori i s'ha de portar sempre cordada. Us l'heu de treure quan sortiu de la sala de treball. S'han de portar guants si la pell de les mans està lesionada o hi ha alguna erupció cutània. S'han de portar ulleres de seguretat per tal d'evitar les esquitxades de microorganismes i altres materials perillosos a la cara.

1.4.1.3. Infraestructura del laboratori (barreres secundàries)

El laboratori de pràctiques de nivell de bioseguretat 1 (LBS 1) no ha d'estar necessàriament separat de l'edifici. Generalment, el laboratori no ha de tenir una infraestructura especial, ja que el treball es fa normalment a la superfície de les lleixes i es fan servir tècniques microbiològiques bàsiques.

Al laboratori de pràctiques hi ha d'haver un lavabo per poder rentar-se les mans. El laboratori ha de ser fàcil de netejar. Les lleixes han de ser impermeables a l'aigua, resistents als àcids, als àlcals, als solvents orgànics i a la calor moderada. Els mobles del laboratori han de ser resistents i fàcils de netejar.

1.4.2. Laboratori de bioseguretat 2 (LBS 2)

Les tècniques i pràctiques de laboratori, les barreres primàries i la construcció d'un laboratori de nivell de bioseguretat 2, són aplicables a laboratoris educatius, de diagnòstic o d'altres tipus on es treballa amb microorganismes que poden produir malalties als éssers humans. Els riscos primaris del personal que treballa amb aquests agents estan relacionats amb exposicions accidentals de membranes mucoses i de la pell, i amb la ingestió de materials infecciosos.

1.4.2.1. Pràctiques de laboratori bàsiques

Als laboratoris de nivell de bioseguretat 2 es fan servir les pràctiques microbiològiques bàsiques descrites en el LBS 1. A més a més, l'accés al laboratori està restringit. S'ha de posar el símbol de risc biològic a la porta d'accés al laboratori i s'ha d'informar del microorganisme amb el qual es treballa i de qui és el responsable del treball. S'ha d'anar amb molt de compte durant la manipulació amb material punyent i tallant contaminat. El laboratori ha de disposar d'un manual de bioseguretat.

1.4.2.2. Equipament de laboratori (barreres primàries)

El laboratori de nivell de bioseguretat 2 ha de disposar de cabines de seguretat biològica del tipus I o II per dur a terme els procediments que tinguin un risc de produir aerosols. La resta de la feina es pot fer a la superfície de la lleixa. S'ha de portar bata de laboratori, però aquesta no es pot portar fora del laboratori. S'han de portar guants i mascareta quan s'està en contacte amb material contaminat o es poden produir aerosols en treballar.

1.4.2.3. Infraestructura del laboratori (barreres secundàries)

Al laboratori de nivell de bioseguretat 2 hi ha d'haver una autoclau per esterilitzar el material residual contaminat.

1.4.3. Laboratori de bioseguretat 3 (LBS 3)

Aquest laboratori està dissenyat per treballar amb microorganismes indígenes o exòtics amb potencial de transmissió respiratòria i que poden provocar infeccions greus i potencialment letals. Per tant, als riscos primaris del personal esmentats en l'apartat de l'LBS 2, s'hi ha d'afegir l'exposició a aerosols infecciosos.

1.4.3.1. Pràctiques de laboratori bàsiques

L'accés al laboratori està controlat. Només pot entrar-hi personal directament implicat en la feina. S'ha de descontaminar el material abans d'eliminar-lo. La roba de laboratori s'ha de descontaminar abans de rentar-la. S'ha de fer un control sanitari del personal que treballa al laboratori.

1.4.3.2. Equipament de laboratori (barreres primàries)

En un laboratori de nivell de bioseguretat 3, totes les manipulacions es fan en cabines de seguretat del tipus I o II per tal d'evitar el risc que pot representar la producció d'aerosols.

A més de la roba de laboratori, s'ha de portar bata de laboratori, que no es pot portar fora del laboratori. També s'han de portar ulleres, mascareta i guants durant el treball diari.

1.4.2.3. Infraestructura del laboratori (barreres secundàries)

El laboratori de nivell de bioseguretat 3 ha d'estar separat físicament dels passadissos d'accés i de la resta del laboratori per una doble porta amb tanca hermètica. Dins del laboratori, l'aire ha de tenir pressió negativa. L'aire de la sortida de la ventilació no es pot reciclar.

1.4.4. Laboratori de bioseguretat 4 (LBS 4)

Aquest tipus de laboratori està dissenyat per treballar amb microorganismes perillosos o exòtics que comporten un alt risc de malaltia greu, que poden transmetre's a través d'aerosols i per als quals no existeixen vacunes o teràpies disponibles, per exemple, el virus d'Ebola. Per tant, són laboratoris molt especialitzats i dels quals n'hi ha molt pocs al món. La seguretat s'aconsegueix amb un aïllament total de l'exterior.

1.5. 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.

Flemig D.O. and Hunt D.L. (eds.). 2000. *Biological Safety: Principles and Practices*, 3rd ed. ASM Press. Washington, D.C.

MICHIGAN STATE UNIVERSITY. 1998. *Biosafety Manual*. Michigan University Press.

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 técnica 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.

Richmond J.Y. and McKinney R (eds.). 1999. *Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina*. 4^a ed. CDC and NIH. Atlanta, GA.