

Introducción, reglas y normas de seguridad y epidemiología

Objetivos:

1. Discutir el prontuario, reglas de seguridad y normas en el laboratorio.
2. Repasar los conceptos y métodos usados para realizar las técnicas asépticas, tinción Gram.
3. Repasar las técnicas de aislamiento de cultivos puros en específico estriado en cuatro cuadrantes.

I. Reglas de seguridad y normas en el laboratorio

Todo estudiante deberá leer cuidadosamente las reglas de seguridad y las normas que aparecen a continuación.

1. Está **TERMINANTEMENTE PROHIBIDO** fumar, comer, ingerir bebidas, masticar goma de mascar, manipular lentes de contacto y aplicarse cosméticos en el laboratorio.
2. Es compulsorio el uso de una bata de laboratorio para prevenir contaminación y para protegerlo de algún tipo de accidente como: salpicaduras con tintes o reactivos químicos, soluciones o cultivos vivos. Debe tener la bata abotonada. Ningún estudiante sin bata será admitido en el laboratorio. Se usarán gafas de seguridad, mascarillas y guantes cuando sean requeridos.
3. Por razones de seguridad se **PROHIBE** el uso de pantalones cortos y/o faldas cortas. Tampoco se permitirá el uso de blusas o camisetas de manguillos, sin mangas o blusas que muestren el abdomen. Los zapatos se usarán cerrados, no serán permitidas las chanclas, sandalias, ni “cros”. No se permite calzados que tengas aperturas que permita tener piel expuesta.
4. El pelo largo debe mantenerlo recogido siempre. No se permite el uso de gorras.
5. Tome todas las precauciones necesarias para evitar accidentes. En caso de que estos ocurran, infórmelo inmediatamente al instructor.
6. En el laboratorio de microbiología, los cultivos serán manejados como patógenos potenciales, entiéndase, organismos causantes de enfermedades. Estos deben estar bien rotulados y si son caldos, deben ser colocados en gradillas. Si se derrama algún cultivo líquido o se rompe un tubo inoculado con cualquier microorganismo, se deberá cubrir el área con papel toalla y desinfectante por lo menos por 15 min. Luego deberá remover y descartar éste según las instrucciones del instructor. Si se vierte algún cultivo en la mesa, piso o encima de su ropa, deberá notificarlo inmediatamente a su instructor, profesor o técnico de laboratorio.
7. Deberá rotular e identificar debidamente todos los materiales o cultivos que utilice en los laboratorios.
8. Nunca deberá pipetear con la boca.
9. Deberán conocer la ubicación de los equipos de seguridad tales como: manta, extinguidores, botiquín de primeros auxilios entre otros. De igual forma, deberán conocer la ubicación de las salidas de emergencia como las rutas de desalojos.
10. De surgir alguna emergencia (fuego, escape de gas, etc.) deberá abandonar el laboratorio a la mayor brevedad posible en estricto orden siguiendo las debidas instrucciones. En caso de algún accidente, cada laboratorio o salón cuenta con una lista para llamadas de emergencia a diferentes hospitales, Guardia Universitaria o Servicios Médicos.
11. No deberá manipular ninguna cristalería mojada.

12. Si tuviese que colocar algún tapón, ya sea de goma, corcho o cristal en un envase de cristal, se recomienda lubricarlo previamente. Al colocar pipetas en los pipeteadores, recuerde no forzarlas para evitar que se rompan.
13. No se deben abrir las llaves de gas, vacío o de agua si no las va a utilizar.
14. Mantener despejadas las mesas de trabajo y pasillos entre las mesas. El laboratorio tendrá un área designada para dejar los bultos o mochilas.
15. Al terminar el laboratorio deberá limpiar su área de trabajo (con desinfectante si ha trabajado con algún microorganismo).
16. Deben lavarse las manos con agua y jabón antes de comenzar el laboratorio y después de terminar el mismo.
17. Se prohíbe la manipulación de equipo (autoclaves, gabinetes bacteriológicos entre otros) sin la debida autorización.
18. Las hojas de seguridad "Safety Data Sheet" estarán ubicadas en un lugar visible y accesible en el laboratorio.
19. No se debe verter químicos ni materiales biológicos por el fregadero. Utilice el envase provisto por el instructor.
20. Los instructores asignarán los microscopios a ser usados durante el semestre. antes de guardar este en el anaquel, el estudiante revisará que esté colocado con el objetivo de baja magnificación (10X) y sin residuos de aceite de inmersión. Deberán reportar cualquier anomalía en el mismo antes de abandonar el laboratorio
21. Una vez terminada su tarea, remueva todo el material utilizado, devuelva todo el equipo a su lugar, recoja toda la basura o desperdicios y deposítelos donde se le indique. Recuerde colocar las sillas o banquetas debajo de las mesas. Los fregaderos NO SON zafacones, por lo que no debe depositar en ellos ningún tipo de basura (papeles, laminillas, cubreobjetos, etc.) Asegúrese de que estos queden limpios antes de abandonar el laboratorio.
22. Todo desperdicio sólido o líquido (materiales insolubles, trozos de vidrio, etc.) deberán desecharse en los envases apropiados. El instructor le indicará qué se considera material "biohazard" y como se descartará.
23. Si posee alguna condición de salud o impedimento, favor notificarlo al profesor o instructor desde el primer día. Se garantiza el derecho de acomodo razonable para todo aquel estudiante con impedimentos o condiciones que sean documentados y que no constituyan, por sí mismos, incapacidad para los estudios universitarios o un riesgo para las demás personas (Capítulo 2, Artículo 2.3 del Reglamento de Estudiantes del Recinto Universitario de Mayagüez). Después de identificarse con el profesor y la institución, los estudiantes con impedimento recibirán acomodo razonable en sus cursos y evaluaciones. Para más información comuníquese con la Oficina Servicios a Estudiantes con Impedimento (OSEIRUM) en el Decanato de Estudiantes o a los teléfonos 787-265-3864 ó 787-832-4040 x 3372, 2040 y/o por correo electrónico a thyrzia.roura@upr.edu. Adicional puede buscar información en la página de internet: www.uprm.edu/sei
24. No se permite la permanencia de ningún estudiante trabajando sin supervisión en el laboratorio y fuera de horas laborables. Si tuviese que hacerlo, asegúrese de que un instructor, profesor o personal técnico lo acompañe.
25. No se permiten en el laboratorio personas que no estén matriculadas en el mismo. Solo se permitirá estudiantes matriculados de otras secciones del curso si es hablado y aprobado por el coordinador.

26. Está prohibido sacar equipo y materiales del laboratorio.
27. El uso de celulares sin permiso del instructor está terminantemente prohibido durante el laboratorio. Se sugiere que se coloquen en modo de vibrar, silencioso o lo apague antes de entrar al laboratorio. Aparatos electrónicos de entretenimiento personal (IPods, MP3 players, etc.) están prohibidos en el laboratorio. El uso de computadoras personales estará a discreción del instructor. Se prohíbe terminantemente el sacar fotos de quizzes o exámenes cuando se discutan los mismos en el laboratorio. Puede sacar fotos solo de los resultados de las pruebas para uso de sus informes
28. La política del Recinto no permite traer niños y mascotas a la sala de clases ni a laboratorios (Circular del 2 de febrero de 2006 y Circular del 10 de junio de 2013).
29. Los estudiantes deben de observar un comportamiento que no interrumpa las actividades del laboratorio. El uso de lenguaje inapropiado o irrespetuoso hacia el instructor, los empleados, profesores u otros compañeros de laboratorio está totalmente prohibido y conllevará una penalidad del porcentaje final que será estimada por el instructor de laboratorio. Además, constituyen infracciones mayores sancionadas por el Reglamento General de Estudiantes (Capítulo VI, Artículo 6.2). Todos los componentes de la comunidad universitaria tiene el deber de observar una conducta apropiada y respetuosa hacia las demás personas (Capítulo 2, Artículo 2.4 del Reglamento de Estudiantes del Recinto Universitario de Mayagüez).
30. Debe notificar si va salir del laboratorio una vez haya comenzado el mismo.
31. La asistencia al laboratorio es COMPULSORIA y se registrará su asistencia a través del instructor. Tres tardanzas sin justificación equivalen a una ausencia. Se le notificará a su Profesor de conferencia como al coordinador del laboratorio tan pronto usted tenga dos ausencias. Si la ausencia es por enfermedad, se requiere una excusa médica (preferiblemente del Departamento de Servicios Médicos del RUM).
32. Se considerará una ausencia si la tardanza es más de 20 min.
33. Las excusas razonables deberán ser presentadas no mas tarde de una semana.
34. Si la razón de su ausencia es otra deberá presentar la evidencia correspondiente. (Muerte de un familiar-certificado de defunción, Accidente de tránsito- Fotos y copia de la querrela oficial. Cualquier otra razón deberá discutirla con el instructor)
35. Se ofrecerán pruebas cortas que evaluarán los objetivos tanto del laboratorio previo, como de laboratorios actual. Aquel estudiante que por algún motivo haya faltado a una de las pruebas cortas, solo podrá reponerlo en las horas de oficina del instructor y con excusa justificada.
36. Los exámenes serán tomados en los días y horas indicados por su Instructor o Coordinador. En caso de ausentarse a los mismos, deberá presentar una excusa justificada a su Instructor de laboratorio en un término máximo de dos días laborables a partir del día del examen. Solo así se le repondrá el mismo.
37. La falta de honradez, el fraude, el plagio y cualquier otro comportamiento inadecuado con relación a la labor académica será penalizado adjudicando cero puntos al trabajo entregado al cual se evidencie la falta.
38. Estudiantes que se ausenten al laboratorio serán responsables por los materiales y tareas asignadas en el día de su ausencia.
39. Será responsabilidad del estudiante, el leer con anterioridad los laboratorios para que se informe sobre el manejo del equipo, substancias y procedimientos que se utilizarán. Una

vez comenzado el laboratorio, mantenerse atento a los procedimientos y seguir instrucciones.

II. Técnicas Asépticas

A. Las técnicas asépticas son las prácticas que uno implementa en el laboratorio para reducir la contaminación cuando va a trabajar con microorganismo. Es el cuidado que uno tiene para evitar que microorganismos no deseados crezcan en los medios y soluciones que estes manipulando. La contaminación puede ser de parte del material o microorganismo que este manipulando hacia uno, como de uno hacia lo que estás trabajando. El procedimiento o pasos que lleves a cabo ayuda a mantener un ambiente lo mas estéril posible o unas condiciones estériles al trabajar. Las técnicas asépticas incluye: 1) la vestimenta adecuada, 2) limpieza del área de trabajo, 3) el uso de materiales estériles, 4) la forma en que trabajar (organización, precaución, manipulación adecuada de los microorganismos). Si uno lleva a cabo buenas prácticas se reduce los accidentes y la contaminación en el laboratorio.

B. ¿Qué hacer para disminuir la contaminación?

1. Tomar como rutina el mantener limpia y recogida el área. Al momento de trabajar, desinfectar la superficie de trabajo antes y después de realizar manipulación de microorganismos.
2. Lavarse las manos con jabón y secarse con papel toalla al inicio y final de la práctica.
3. Mantener el pelo recogido para evitar accidentes y contaminación con particulado.
4. No usar gorra, sombreros, pulsera, reloj, sortijas y/o accesorios.
5. Usar bata de laboratorio, guantes y gafas de seguridad.
6. Usar medios de cultivos, utensilios y soluciones estériles.
7. Flamear algunos utensilios para reducir contaminación.
8. Flamear la boca de los tubos de ensayos al abrir y cerrar el mismo.
9. No colocar en la superficie de trabajo utensilios contaminados.
10. Trabajar sin distracciones como es el celular y el hablar mientras trabaja.
11. Trabajar con una postura recta en donde tu cuerpo está en forma de L.
12. Mantener puertas y ventanas cerradas para reducir la entrada de contaminantes externos al lugar.
13. Mantener en el área depósitos para materiales contaminados como son zafacones para desperdicios biológicos, recipientes con desinfectantes.
14. Trabajar las muestras biológicas ante la protección de una flama y/o de una cámara de flujo trilaminar.
15. Rotule los materiales antes de comenzar a realizar las transferencias. La rotulación debe proveer: fecha del día en que se transfirió, nombre o iniciales de la persona, nombre o iniciales del medio, nombre de la bacteria o la muestra, código del lab (Biol4375L) y sección (040L).

III. Técnicas de aislamiento de cultivos puros

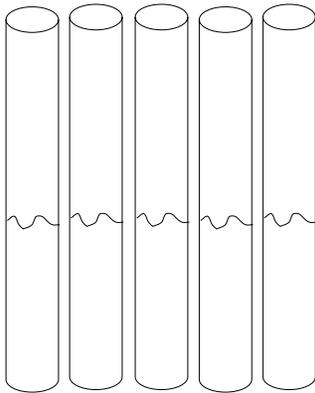
A. Transferencia de caldo a caldo

A través de la transferencia uno mueve o introduce el microorganismo a un medio o solución nueva. Esta técnica se utiliza para subcultivar, para aislar el organismo o para introducirlo a unas

condiciones las cuales desea ver su efecto en él. Las transferencias pueden ser de tubo de ensayo a otro tubo de ensayo, de tubo de ensayo a plato Petri o viceversa como plato Petri a plato Petri.

Práctica: Transferencia de caldo a caldo (grupo de 4 estudiantes)

- a. Cada grupo va tener 5 tubos con Tryptic Soy Broth (TSB): tubo 1 es el inoculo a usar todos, tubo 2 al 5 son los tubos para cada estudiante. Favor de rotular el tubo 1 como inoculo y los otros tubos con las iniciales del estudiante del grupo.
- b. El tubo 1 lo va usar todos los integrantes del grupo para practicar transferencia pero en este caso este tubo no contiene bacterias. Importante que anoten en su libreta quien de los integrantes utilizo primero el tubo 1 y si llevo a cabo las técnicas asépticas correctamente.
- c. Repaso de transferencia: 1) Flamear la aguja de inocular antes de usarla hasta que esté en rojo intenso y esperar a que se enfríe., 2) sujete los tubos en una mano formando una V, 3) destape los tubos usando la mano donde tiene la aguja de inocular, 4) flamear la boca de ambos tubos, 5) insertar la aguja de inocular ya flameada en el tubo 1 para tomar muestra, 6) transferir la aguja de inocular del tubo 1 a su tubo, 7) flamear la bocas de los tubo, colocarle las tapas y colocar los tubos en la gradilla, 8) flamear la aguja de inocular al finalizar la transferencia.
- d. Los 5 tubos se van a incubar a 37 grados por 24 horas. Venir a realizar observaciones en su libreta y tomar fotos de los tubos de su grupo para colocarlas en su libreta. Descarte los tubos en el área asignada luego de observarlos.
- e. Discutir en la libreta los resultados obtenidos. (por qué ocurrió, que cosas o factores afectaron u ocasionaron que se observara eso, etc.)



Observaciones: _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____
--

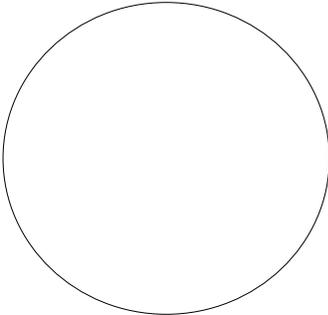
B. Estriado en 4 cuadrantes

Hay métodos que permite poder separar microorganismos que están creciendo juntos y son conocido como esparcido en plato y estriado en cuatro cuadrantes. Este último permite separar microorganismos en células que serán formadoras de colonias usando una aguja de inocular. La técnica permite ir reduciendo la cantidad de bacterias en la aguja en cada sector del plato Petri que inocules. Durante el procedimiento se flamea la aguja para ayudar a diluir la muestra en cada sector o cuadrante del medio y se extrae un poco de muestra de la porción ya inoculada. El

primer cuadrante provee un área en el plato para el inoculo inicial y el más cargado de bacterias. En el segundo cuadrante hasta el cuarto, ocurre una dilución de bacterias ya que se flamea la aguja y se arrastra una muestra del primer cuadrante al segundo. Luego se flamea nuevamente la aguja y se arrastra muestra del segundo al tercero. Se realiza el mismo procedimiento para inocular el cuarto cuadrante.

Práctica: Estriado 4 cuadrantes (cada estudiante va tener un plato Petri con Tryptic Soy Agar (TSA))

- a. Rotule por el borde de la parte de abajo del plato usando un marcador permanente: sus iniciales, fecha, iniciales del medio, Biol 4375L sec ____, nombre de la bacteria. También puede dividir del plato en cuatro secciones y rotular cada sección del 1 al 4.
- b. Flamear la aguja de inocular y dejar enfriar antes de introducirla al cultivo de bacteria.
- c. Tomar el tubo de ensayo que contiene el cultivo de la bacteria en una mano y con la mano que tiene la aguja de inocular, saque la tapa al tubo.
- d. Flamear la boca del tubo con el cultivo e introduzca la aguja de inocular para tomar un poco de muestra. Luego, flamear la boca del tubo y tapanlo.
- e. Abrir el plato Petri evitando colocar la tapa sobre la mesa e inocular en el primer cuadrante. Luego flamear la aguja y extraiga muestra del primer cuadrante al segundo. Realizar el procedimiento anterior para el tercer y cuarto cuadrante.



Observaciones: <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>

IV. Tinción Gram

Esta tinción diferencial permite distinguir entre dos grandes grupos de bacteria: Gram positivas y Gram negativa. La tinción Gram está basada el uso de un tinte primario que es cristal violeta seguido por el agente mordante (yodo) que ayuda a una mejor interacción del tinte primario con la bacteria. Se usa alcohol como agente decolorante que en el caso de las bacterias Gram negativa pierden el complejo yodo-cristal violeta y se ponen incoloras. Sin embargo, las bacterias Gram positivas retienen dicho complejo de tinte primario y mordante. El contra-tinte en esta tinción es la safranina que tiñe las bacterias Gram negativas de rosa. Aunque es una tinción muy usada, la misma, puede dar falsos resultados ya sea porque el cultivo de la bacteria a teñir es viejo o el uso excesivo del agente decolorante. Es recomendable que se use cultivos frescos para realizar la tinción Gram que tenga 18-24 horas de crecimiento. Esta tinción permite diferencial las bacterias por la organización de la pared celular pero también nos permite ver morfología de la bacteria. Se recomienda realizar tinciones a bacterias controles, por ejemplo, *E. coli* ATCC 29922 y *S. aureus* ATCC25923. Esto permite comparar la bacteria desconocida aislada de una muestra con los controles y corroborar que la tinción fue realizada efectivamente.

Práctica: Tinción Gram

- Prepara un frotis en una laminilla limpia usando una pequeña gota de agua en donde inocular un poco de bacteria. Dejar secar el frotis y fijarlo con calor.
- Añadir el cristal violeta sobre el frotis fijado y dejar por 30 segundos.
- Enjuagar con agua y añadir yodo por 1 minuto.
- Enjuagar con agua y añadir el alcohol observando que el alcohol salga incoloro. Importante no añadir mucho alcohol.
- Enjuagar con agua y añadir safranina por 45 segundos.
- Enjuagar con agua y secar en papel Bilabous.

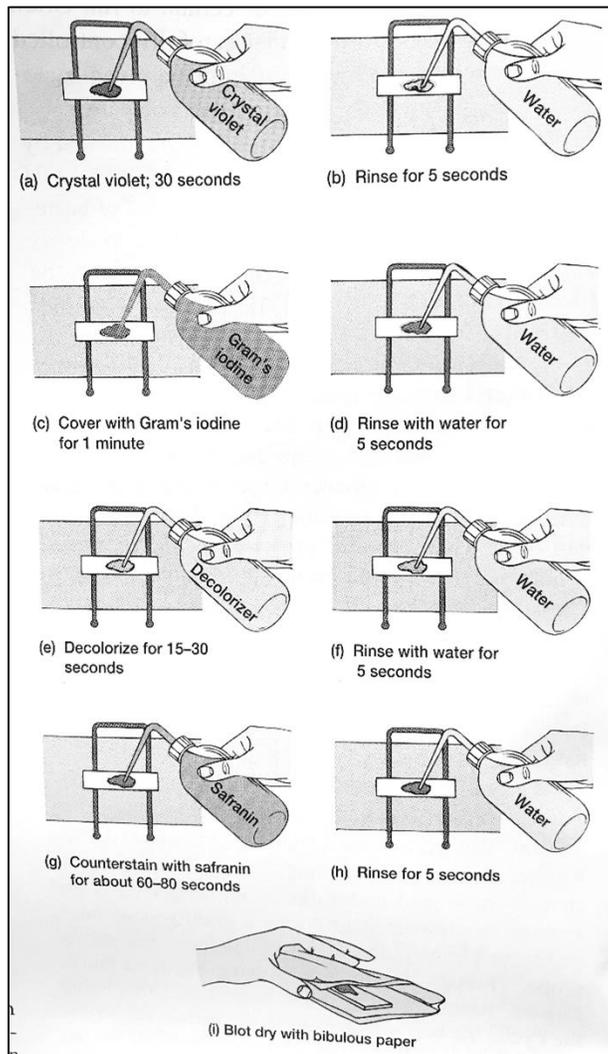
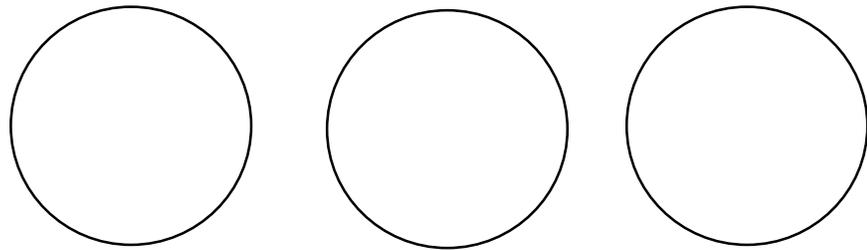


Figura tomada del manual Laboratory Exercises in microbiology,



Nombre Bacteria			
Tipo Gram			

Referencias

Beishir, L. (1991). *Microbiology in practice: A self-instructional laboratory course*. New York: HarperCollins Publishers Inc.

Harley, J.P. & Prescott, L.M. (2002). *Laboratory Exercises in microbiology (5^{ta} ed.)*. New York: McGraw-Hill.