

## MICROBIOLOGÍA

### DE LA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN A LA ESTERILIZACIÓN Y USO DEL MATERIAL DE LABORATORIO

**NOMBRE:** Omar David Franco Navarro **FECHA:** 04-04-2022

#### **Objetivo:**

- Conocer el proceso que hay detrás de cada material estéril en el laboratorio

#### **Introducción.**

En un laboratorio resulta indispensable contar con material estéril, ya que esto permite un correcto análisis de las muestras obtenidas o pruebas realizadas, el proceso de esterilización está relacionado con los términos de limpieza y desinfección, ya que para asegurar un proceso de esterilización es necesaria una limpieza previa y desinfección, esto por sí solo no asegura una muestra libre de contaminantes, debido a que durante la manipulación del material ya estéril o toma de la muestra se pueden cometer errores, tanto al momento de liberar el material de su empaque o envoltura estéril, como al momento de realizar algún procedimiento.

Usualmente, al entrar a una Central de Equipos y Esterilización (CEYE), una Unidad Central de Esterilización (UCE) o a un laboratorio, se cuenta con material ya estéril, es decir aquel que presenta las condiciones ideales para poder realizar algún estudio o en su caso ingresar dicho material o instrumentos al organismo, es allí donde se muestra la gran importancia de la esterilización, dicho proceso asegurará trabajar libre de microorganismos o contaminantes, tanto en un laboratorio como en una unidad de cuidados médicos, en esta última, pudiendo ser dentro de una sala de quirófano.

A fin de cuentas, para llevar a cabo una buena práctica es necesario conocer el proceso que permite una esterilización eficaz, el uso correcto del material y técnicas de higiene y seguridad. dichas medidas permitirán evitar por dar un ejemplo una infección en el paciente y/o análisis/resultados alterados, lo cual conlleva a un mal diagnóstico, tratamiento y/o rehabilitación, representando para el paciente/usuario pérdidas y desgaste, esto siendo conservadores. Por último hay que resaltar la importancia de los conocimientos suficientes para realizar cada una de las intervenciones necesarias, ya que esto es lo que realmente hará

valer todo el esfuerzo que hay detrás del material estéril, cuando se habla de tinciones, se hace mención de procesos complejos, sistemáticos y rigurosos, para los cuales hay que ser muy preciso en cuanto a tiempos de exposición e interpretación de resultados.

## Material

<i>Práctica: Preparación de material</i>	<i>Práctica: Preparación de medios de cultivo</i>	<i>Práctica: Cultivo microbiano</i>
Cristalería que se vaya a esterilizar	Cajas Petri	Cajas Petri con medio de cultivo
Algodón	Matraz Erlen Meyer	Mechero
Papel Estraza, un rollo grande	Vaso de precipitado	Medios de cultivo elaborados en la práctica anterior
Cinta masking tape	Tripie	Caja de material
Isopos largos	Tela de alambre	Hisopos
Gasas	Mechero	Asa bacteriológica
Cloro comercial 250 ml.	Agua	
Agua destilada	Pipeta	
	Cuchara desechable	
	Solución de cloro	
	Caja de material	
	Grenetina	

## PROCEDIMIENTO PRÁCTICA 1

1. Preparar solución clorada respetando la fórmula 9 porciones de agua por una de cloro (preparar cantidad de solución en proporción al material a esterilizar).
2. Limpiar con agua y jabón el material a esterilizar, previo a su desinfección con solución clorada.
3. Realizar desinfección con cloro: verter solución clorada en cada recipiente a esterilizar y rotar el recipiente a manera de que la solución cubra toda su superficie.
4. Realizar tapones de algodón y colocarlos a los tubos de ensayo y matraz, de igual manera, realizar protección con papel estraza y colocarlos sobre los tapones de algodón.
5. Envolver las cajas Petri con papel estraza cubriendo por completo su superficie y a manera de facilitar su apertura cuando se llegue a utilizar y de esta manera evitar movimientos innecesarios que pudiesen provocar errores en el procedimiento o manipular demasiado el material.
6. Proceder a envolver vasos de precipitado comenzando en estos con la parte superior y de igual manera la pipeta con papel estraza, siendo muy cuidadosos en esta última, para ello se debe de realizar dobleces en los extremos para sellar la superficie de esta, de igual manera manteniendo la precaución de cubrir por completo su superficie, utilizar cinta (testigo/masking tape) para asegurar un buen sellado procurando utilizar una mínima cantidad.

## PROCEDIMIENTO PRÁCTICA 2

### I Preparación del medio de cultivo

1. En 100 ml. De agua fría diluye 5 grs. De grenetina, una vez diluida y completamente sin grumos, calienta hasta lograr diluir cualquier tipo de partícula sólida, no deberás dejar ebulir
2. Cubrir con papel para evitar que se contamine la solución, hervir con el tapón a fuego lento para eliminar cualquier m.o.o
3. Y dejarla enfriar cerca el mechero
4. En ningún momento se debe apagar el mechero y tampoco se debe separar la solución del mechero

### II Vaciado

1. Lavar previo a su uso cualquier material de cristalería, en especial las cajas Petri
2. Desinfectar con solución clorada y colocar en posición invertida, cercana al mechero.
3. **Marcar en la parte lateral la caja Petri previo a ser usada**
4. La caja Petri deberá cerrarse previo al vaciado.
5. Se flameará la boca del matraz antes de hacer el vaciado
6. Se acerca el matraz y la caja a la flama, se vacía una porción del medio de cultivo en la caja Petri en una porción menor a la mitad de la caja, para ello:

7. Tomar una caja con la mano izquierda, colocarla frente al mechero y destaparla parcialmente.
8. Verter aproximadamente 20 ml del medio en la primera caja de Petri con la mano derecha.
9. Tapar inmediatamente la caja de Petri.
10. Trasladar la caja debidamente tapada, a la derecha del mechero con la mano izquierda, evitando agitar el contenido de la caja.( No la aleje más de 50 cm. de distancia de la llama del mechero)
11. Flamear de nuevo la boca del Erlenmeyer.
12. Repetir el mismo procedimiento desde el inciso
13. Con la mano izquierda, destapar parcialmente la caja de Petri, sin soltar la tapa superior.
14. Dejar solidificar el medio por término de 30 minutos.

### **PROCEDIMIENTO PRÁCTICA 3**

#### **Toma de muestra.**

Hisopado de amígdalas.

1. Antes de tomar la muestra, póngase la mascarilla y los guantes.
2. Coloque al paciente sentado frente a usted y pídale que trague fuertemente dos veces.
3. Pida al paciente que vea hacia arriba, con la boca abierta, que saque la lengua y diga AH AH.
4. Con un abatelenguas, presione fuertemente la lengua hacia abajo y simultáneamente, si es posible, iluminar bien el fondo de la garganta (detrás de la úvula o campanilla), con una lámpara portátil de baterías.
5. Localizar en el fondo de la garganta y en las amígdalas, que se encuentran a los lados, las siguientes lesiones: Inflamación (enrojecimiento). Pus (secreción blanquecina o amarillenta). Ulceras blanquecinas.
6. Con el hisopo estéril frotar firmemente las lesiones, con sumo cuidado de no tocar la lengua, la campanilla, la pared interna de los carrillos (cachetes) o los labios, al momento de retirar el hisopo.
7. Trabaje todo el procedimiento frente a la llama del Mechero Bunsen.

#### **PARTE II. Inoculación del medio de cultivo**

1. Descargue inmediatamente la muestra tomada con el hisopo en la caja de agar.

2. Con el hisopo, estríe en tres secciones la caja.

3. Incubar.

### **PARTE III. Preparación del frotis**

1. Rotule dos láminas portaobjetos limpios y desgrasados con su nombre

2. Utilice el mismo hisopo con el que inoculó la caja de medio de cultivo y haga un frotis.

3. Deje secar a temperatura ambiente.

4. Fije a la llama.

5. Coloree con tinción de Gram

6. Observe al microscopio

### **PARTE IV. Tinción de Gram**

1. Use la lámina que preparó en la Parte III del procedimiento para la coloración con tinción de Gram.

2. Cubra la lámina con solución Cristal Violeta y déjelo actuar por un minuto.

3. Lave con agua de chorro y escurra.

4. Cúbrela con solución de Lugol durante un minuto.

5. Lávela con agua de chorro y escurra.

6. Cubra el frotis con alcohol acetona por un minuto.

7. Lave con agua de chorro y escurra.

8. Cubra la lámina con solución de Safranina durante un minuto.

9. Escurra el colorante y lave la lámina con agua de chorro. Escurra y deje secar a temperatura ambiente

## OBSERVACIONES

LA práctica 1 como la practica 2 y 3, se realizaron en distinto día, sin embargo, muestran una secuencia, es por lo que decidí nombrar este reporte de práctica como **(DE LA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN A LA ESTERILIZACIÓN Y USO DEL MATERIAL DE LABORATORIO)**.

### Práctica número 1

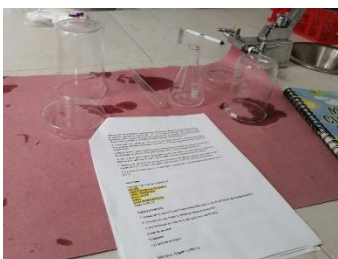


Al iniciar con la práctica, se realiza higiene de manos y limpieza con agua y jabón del material de cristalería a utilizar

Se procede a preparar solución de cloro diluida respetando la fórmula 9 porciones de agua por 1 de cloro, preparando únicamente lo que se va a necesitar para evitar desperdicios



Una vez preparada la solución de cloro diluida, se procede a verter cantidad suficiente de esta en los recipientes, realizar movimientos rotatorios a manera de cubrir toda la superficie interior.



Se deja escurrir el excedente de cloro, colocando los materiales hacia abajo sobre el papel estraza.

Se elaboran tapones de algodón para los tubos de ensaye, matraz y pipeta, de igual manera, se elaboran protecciones que cubrirán el tapón de algodón.



Una vez listas estas protecciones, se procede a colocarlas en el material, cubriendo el orificio de entrada de los tubos, pipeta y matraz, posterior se agregan encima las protecciones elaboradas con papel estraza.

Tener en cuenta las recomendaciones que se encuentran dentro del procedimiento de práctica al momento de envolver el material.

## OBSERVACIONES

### Práctica número 2



Para comenzar la práctica se debe preparar el medio, para ello se utilizará 100 ml de agua y 5gr o 1 cucharada de gredina, ambos componentes se mezclan para lograr deshacer lo más posible los grumos presentes, todo esto en un vaso de precipitado.



Una vez preparada la mezcla, se cubre con papel despedaza y se coloca sobre el mechero con la tela de alambre, se deja hasta que hierba y se retira dejando enfriar.



Se procede a la limpieza y desinfección de las cajas Petri antes de colocar el medio de cultivo. Tener en cuenta que una vez desinfectadas con cloro, su manipulación debe ser mínima.

Se agrega el medio de cultivo (20 ml aprox) a las cajas Petri previamente flameando la boca del matraz con mucha precaución y se cierra la caja

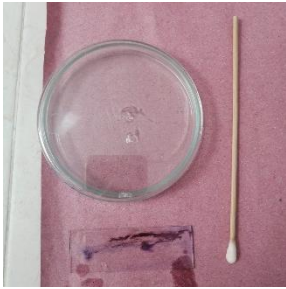


Cada vez que se agregue el medio de cultivo a la caja Petri, recordar flamear el matraz y la caja

Se colocan las cajas ya con el medio de cultivo en un lugar seguro

## OBSERVACIONES

### Práctica número 3

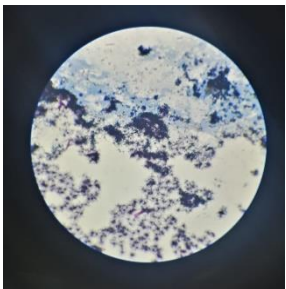


Se realiza la toma de muestra con uso de EPP, teniendo la precaución de no producir el reflejo vagal frotar el hisopo estéril a las paredes del fondo de la garganta y amígdalas.

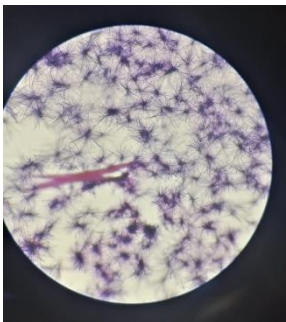
Se realiza la inoculación del medio de cultivo previamente preparado, realizando estrías en tres secciones distintas de la caja.

Con el hisopo que se utilizó para la toma de muestra, preparar el frotis, posterior realizar la tinción Gram en las láminas preparadas.

Es muy importante ser exactos con los tiempos de exposición al momento de la tinción Gram, de lo contrario, la muestra sería alterada



En la muestra 1 se logra observar bacterias grampositivas en campo tras observar con el objetivo de 40x, tomaron forma de estrellas debido a un tiempo de exposición excesivo al Cristal Violeta, muy poca concentración de bacterias gramnegativas.



En la muestra 2 se observan bacterias grampositivas y gramnegativas, siendo estas últimas escasas en campo, esto observado con el objetivo de 40x, de igual manera con forma de estrellas.

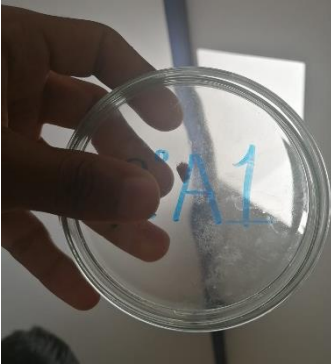


En la muestra 3 se identifica mayor concentración de bacterias gramnegativas a comparación de las muestras 1 y 2, presenta de igual manera bacterias grampositivas que predominan a las gramnegativas, en otra superficie de la muestra se observa comida y células de descamación de epitelio.



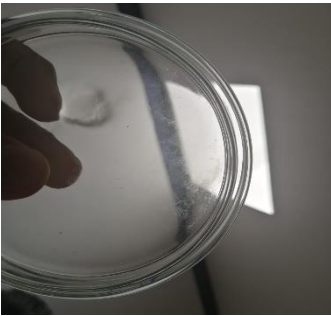
## OBSERVACIONES

### Práctica número 3



Cultivo en caja Petri 1

Sin presencia de colonias o crecimiento bacteriano, lo mismo que sucede con la muestra 2 y 3, solo se pueden notar levemente las estrías realizadas en el momento del cultivo.



Cultivo en caja Petri 2



Cultivo en caja Petri 3

## **RESULTADOS**

La preparación de materiales de laboratorio se realizó de manera exitosa, ya que se logró cubrir los distintos materiales por toda su superficie, haciendo uso óptimo del papel estraza y no permitiendo el contacto de la superficie al exterior, afirmo que fue exitosa ya que se limpió, desinfectó y cubrió el material completamente.

A pesar de que las bacterias se cristalizaron por una exposición prolongada al Cristal Violeta, fue una práctica exitosa, ya que se pudo identificar su presencia y concentración en las muestras tras exploración microscópica, sin embargo, no se identificó crecimiento o formación de colonias en las cajas Petri, lo cual se le puede atribuir a un error técnico al momento de realizar el cultivo o en la preparación del medio de cultivo.

## **CONCLUSIONES**

Las bacterias son microorganismos que se encuentran por naturaleza en el cuerpo humano, sin embargo las variaciones en las concentraciones de estas producen cambios/alteraciones en el organismo, llegando a ser mas o menos perjudiciales dependiendo de la bacteria causante, es por ello que un diagnóstico y tratamiento adecuado permitirán aliviar los síntomas y terminar con la enfermedad, en el caso de un tratamiento incorrecto o deficiente, únicamente se contribuirá a aumentar la resistencia bacteriana a antibióticos.

## **CUESTIONARIO**

### **¿Qué es un medio sólido en microbiología?**

Un medio de cultivo es un conjunto de componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. Los medios de cultivo sólidos contienen el agente solidificante (generalmente agar al 1,5-2%).

### **¿Qué es flamear?**

El flameado es un método de desinfección físico por calor seco por fuego directo, con esto conseguimos que el utensilio que vayamos a utilizar este desesterilizado para que no se contamine nuestros utensilios.

### **¿Cómo se realiza el método de siembra por estría?**

Se realiza en un tubo con medio sólido inclinado (en bisel o pico de flauta), y deslizando el asa sobre la superficie expuesta del agar de manera que se marquen surcos o estrías.

### **¿Por qué no se debe hablar durante los procedimientos de determinación de presencia de microorganismos?**

Porque constituye una forma de contaminación artificial de la muestra

### **¿Que son los medios de enriquecimiento?**

Son medios líquidos que favorecen o permiten la multiplicación de las bacterias cuando la muestra obtenida es muy pobre

### **Buenas prácticas en un laboratorio**

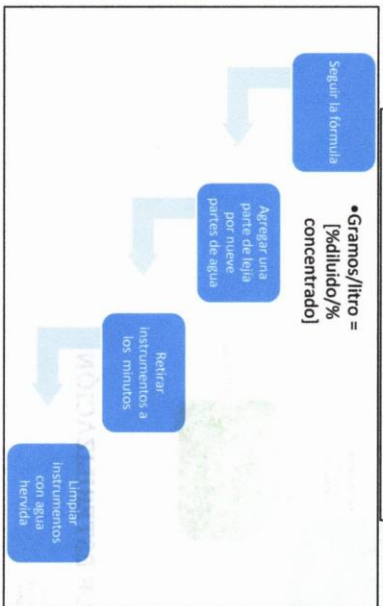
- Anotar los resultados de forma estandarizada: Todos los miembros del laboratorio deben llenar observaciones y resultados de preferencia en un mismo formato y nunca en papeles sueltos; ya que pueden llegar a perderse o falsificarse
- Etiquetar muestras, reactivos y todo aquello que sale de su empaque original, de esta forma todos los compañeros sabrán que hay en ese envase en específico y evitaremos contaminación de muestra o accidentes
- Utilizar siempre material de vidrio limpio para evitar contaminación cruzada, razón por la cual tampoco debe reutilizarse material desechable
- Nunca calentar material de vidrio calibrado
- Los reactivos deben tener certificados que especifiquen los grados máximos de impurezas para asegurar que se está utilizando un material que cumple las exigencias del estudio en cuestión
- Cuando sea posible hacer muestras en duplicado
- Realizar chequeos rutinarios por una persona calificada y externa al laboratorio, para comprobar los procedimientos y resultados, y asegurar que el manejo del trabajo está siendo conducido apropiadamente, comprobando así que los resultados obtenidos son fiables.
- No comer, ni beber, ni fumar, ni guardar los alimentos en el laboratorio.
- Utilizar en el laboratorio exclusivamente el equipo esencial y el cuaderno o libreta de laboratorio.
- Utiliza siempre bata y ropa especial, si se trabaja con organismos patógenos.
- No trabajar con cultivos, si se tiene sueño o se está muy cansado.
- Si se llevan los cabellos largos, es conveniente recogerlos en una cola o, mejor aún, dentro de un gorro de laboratorio.
- No tocarse nunca los ojos, sin haberse lavado bien las manos antes.
- No dejes nunca los cultivos fuera de las áreas de incubación (estufas) o almacenes (cámaras frías, congeladores).
- El desorden en las zonas de trabajo equivale a riesgo.
- No utilizar pipetas convencionales (pipeteo con la boca); si fuese imprescindible su uso, utilizarlas con aspiradores.
- Los cortes que cualquier persona se produzca en el laboratorio tienen que tratarse rápidamente y con especial cuidado. Si se tienen heridas abiertas, deben protegerse antes de seguir trabajando
- Las personas con deficiencias inmunitarias o problemas de salud específicos tendrán que consultar, con los facultativos que les atienden, las precauciones especiales que les convendría tomar.
- Los laboratorios han de estar convenientemente señalizados, para que cualquier persona que acceda a ellos sepa que corre un cierto riesgo, del cual debe informarse.

Práctica: Preparación del material.

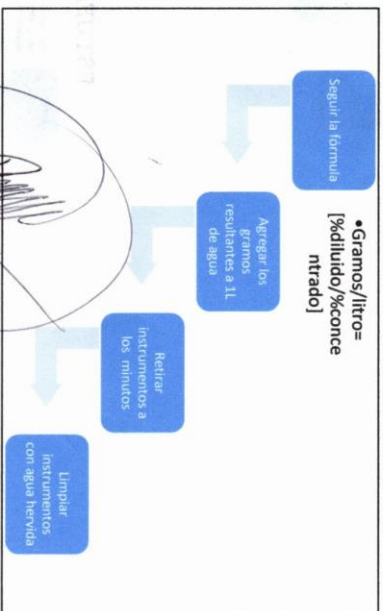
Camí David Franco N.

### PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE CLORO

#### (Cloro en polvo comercial 5%)



#### Solución de cloro (35%)

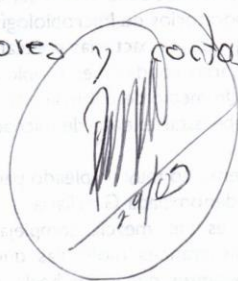


Apuntes prácticas (Preparación de material).

- Es importante realizar una dilución clorada para evitar reducir la eficacia del cloro o producir efectos tóxicos. "45ml/litro + 5 ml"
- Esperar la solución clorada es fundamental. La cual debe ser por toda la superficie interna y así lograr una correcta desinfección.
- Colocar barrera de algodón en la entrada, tubos de ensayo para realizar un filtro y evitar acceso de microorganismos.
- Al empaquetar el material, tener la precaución de cerrar por completo la superficie para evitar contacto directo con el ambiente y dañar el material y asegurar esterilidad.

Práctica: Preparación de medios de cultivo.  
Observaciones.

- Solución clorada dispersa en el material de cristalería
- La importancia de no aflojar la cristalería del mechero recalcó en preservar el campo de esterilidad.
- No abrir a más de 1 cm los ojos petri para preservar las condiciones óptimas para el cultivo.
- Repetir el flameado del matraz las veces que sea necesario para verter la preparación/solución de ginselina.
- El cuidado durante el transporte y manipulación de los ojos petri permite tener un medio de cultivo ideal para evitar la presencia de m.o.o
- La correcta dispersión del material en la mesa de trabajo permite prevenir errores y contaminar el material.



Omar David Franco N.

Muestra 3 Práctica: Cultivo microbiano.  
Omar David Franco N.  
Bacterias grampositivas en mayor cantidad que gram  
negativas. > Cantidad de gram negativas que las otras

2. Utilice el mismo hisopo con el que inoculó la caja de medio de cultivo y haga un frotis.
3. Deje secar a temperatura ambiente.
4. Fije a la llama.
5. Coloree con tinción de Gram
6. Observe al microscopio

Se observan fragmentos de  
40-100x. comida, células de  
descamación de epitelio.

#### PARTE IV. Tinción de Gram

1. Use la lámina que preparó en la Parte III del procedimiento para la coloración con tinción de Gram.
2. Cubra la lámina con solución Cristal Violeta y déjelo actuar por un minuto.
3. Lave con agua de chorro y escurra.
4. Cúbrela con solución de Lugol durante un minuto.
5. Lávela con agua de chorro y escurra.
6. Cubra el frotis con alcohol acetona por un minuto.
7. Lave con agua de chorro y escurra.
8. Cubra la lámina con solución de Safranina durante un minuto.
9. Escurra el colorante y lave la lámina con agua de chorro. Escurra y deje secar a temperatura ambiente.

#### Cuidados y otros aspectos relevantes de seguridad

1. Lávese las manos después de realizar cualquier tarea dentro de laboratorio de microbiología.
2. Todo el material empleado en las prácticas microbiológicas se descarta en las bolsas
3. No dejar por ningún motivo cajas, tubos o cualquier otro material contaminado, en lugares que no corresponda al área de trabajo.
4. NINGUN EQUIPO DE PROTECCIÓN SUSTITUYE EL CUIDADO, ORDEN Y PRECAUCIÓN QUE DEBE TENER CADA ESTUDIANTE AL REALIZAR SU TRABAJO

#### Cuestionario

- 1.- ¿Qué es un medio sólido en microbiología?
- 2.- ¿Qué es flamear?
- 3.- ¿Cómo se realiza el método de siembra por estría?

1. Muestra 1 - Se observan bacterias grampositivas en forma  
estrietas (Amanaron esa forma al aumentar el tiempo de expo-  
al cristal violeta). Menor cantidad bacteria gramnegativas. 40x

2. Muestra se observan gramnegativas en mayor cantidad  
y grampositivas en También estrelladas. Ob. 40x.