

Núria Borrell
Xavier Mesquida
Pedro Alomar

17.1. Introducción

El nivel de bioseguridad laboral sigue siendo una área de especial interés para el personal que trabaja en un laboratorio de Microbiología clínica. El manejo y procesado de las muestras clínicas implica el aislamiento de un gran número de agentes infecciosos, muchos de los cuales, sobre todo los hongos, tienen gran facilidad para formar una suspensión aérea a partir del medio de cultivo. En la naturaleza, la mayoría de los hongos filamentosos desarrollan estructuras que se dispersan en el aire (conidios, cuerpos fructíferos aéreos o artroconidios) y pueden permanecer en el ambiente durante periodos prolongados de tiempo, resistiendo a la desecación.

Entre las infecciones adquiridas en el laboratorio la infección fúngica representa el 9%, en su mayoría debida a hongos dimórficos [1]. Porcentaje no despreciable teniendo en cuenta la baja frecuencia de aislamiento de estos microorganismos. Además de estas, otras muchas infecciones fúngicas pueden ser adquiridas en el laboratorio, constituyendo un riesgo ocupacional bien reconocido para los micólogos [2].

Sin embargo, el riesgo de adquisición de infección en los laboratorios puede verse minimizado con el empleo de un conjunto de normas de seguridad, basadas tanto en el método de procesamiento de la muestra como en el uso de un equipamiento de protección personal.

La ruta de transmisión es uno de los elementos más fáciles de considerar a la hora de establecer unas normas de bioseguridad. La vía respiratoria y el contacto directo con piel y mucosas son las vías más comunes para la infección fúngica en el laboratorio.

17.2. Principios básicos de la seguridad biológica

17.2.1. Clasificación de los agentes biológicos por su grupo de riesgo

El determinante más importante en el riesgo biológico es la patogenicidad del microorganismo. Cada agente infeccioso tiene asignado un grupo de riesgo en función de su virulencia (historia de infección adquirida en la comunidad), su potencial epidémico, la dosis requerida para iniciar la infección (dosis infectiva), la ruta de infección o de transmisión (tanto en el laboratorio como en la comunidad), el espectro de huéspedes susceptibles incluyendo los reservorios animales y sus vectores, la viabilidad del agente infeccioso en el entorno del laboratorio y la existencia de tratamiento [3].

Se define como agente biológico de:

- Grupo 1: Aquel que resulta poco probable que cause una enfermedad en el hombre.
- Grupo 2: Aquel que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis y tratamiento eficaz.
- Grupo 3: Aquel que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los trabajadores, con riesgo de que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis y tratamiento eficaz.
- Grupo 4: Aquel que causando enfermedad grave en el hombre supone un serio peligro para los trabajadores, con muchas probabilidades que se propague a la comunidad y sin que exista generalmente una profilaxis y un tratamiento eficaz.

En la **Tabla 17.1** se presenta una lista de distintos hongos, clasificados en función de su riesgo de infección y su capacidad alérgica, según la normativa española vigente, descrita en el Real Decreto 664/1997 [4].

Tabla 17.1. Clasificación de los hongos en grupos de riesgo según el Real Decreto 664/1997 [4].

Hongo	Grupo
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2 ^a
<i>Blastomyces dermatitidis</i> (<i>Ajellomyces dermatitidis</i>)	3
<i>Candida albicans</i>	2 ^a
<i>Cladophialophora bantiana</i> (<i>Xylohypha bantiana</i> , <i>Cladosporium bantianum</i> o <i>trichoides</i>)	3
<i>Candida tropicalis</i>	2
<i>Coccidioides immitis</i>	3 ^a
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>)	2 ^a
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i> (<i>Filobasidiella bacillispora</i>)	2 ^a
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>parva</i>	2
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>crescens</i>	2
<i>Epydermophyton floccosum</i>	2 ^a
<i>Fonsecaea compacta</i>	2
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	2
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> (<i>Ajellomyces capsulatus</i>)	3
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	3
<i>Madurella grisea</i>	2
<i>Madurella mycetomatis</i>	2
<i>Microsporium</i> spp.	2 ^a
<i>Neotestudina rosatii</i>	2
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	3
<i>Penicillium marneffeii</i>	2 ^a
<i>Scedosporium apiospermum</i> (<i>Pseudallescheria boidii</i>)	2
<i>Scedosporium prolificans</i> (<i>inflatum</i>)	2
<i>Sporothrix schenckii</i>	2
<i>Trichophyton rubrum</i>	2
<i>Trichophyton</i> spp.	2

a: Posibles efectos alérgicos

17.2.2. Niveles de contención

La seguridad biológica se fundamenta en tres elementos: las técnicas de laboratorio, el equipo de seguridad o barreras primarias y el diseño de la instalación o barreras secundarias [3].

El término “contención” se emplea para describir los métodos que hacen seguro el manejo de materiales infecciosos en el laboratorio, para reducir

al mínimo la exposición del personal. Se suelen describir cuatro niveles de contención o seguridad biológica, que consiste en la combinación, en menor y mayor grado, de los tres elementos de seguridad biológica descritos (técnicas de laboratorio, barreras primarias y barreras secundarias). En el caso concreto del área de Micología las medidas descritas para nivel de contención 2 son las adecuadas, a excepción de aquellos casos en que se conozca la identidad de la cepa fúngica y se corresponda con un hongo dimórfico (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*) o con *Cladophialophora bantiana* que requerirían nivel de contención 3 (Tabla 17.1). Todas ellas son las que se describen

en los siguientes Apartados.

17.3. Normas generales de seguridad biológica

En nuestro país, la protección de los trabajadores frente a los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos está regulada por el Real Decreto (RD) 664/97 y la adaptación contenida en la Orden de 25 de marzo de 1998 [4]. Según este decreto el responsable inmediato de la Seguridad y las Condiciones de Trabajo en el Laboratorio es el jefe del laboratorio. Debe supervisar y mantener actualizado el Manual de Seguridad propio que debe ser entregado a todos los trabajadores del laboratorio.

Las normas generales son comunes para las distintas áreas del laboratorio con nivel de contención 2 y de obligado cumplimiento en cualquiera de ellas [3].

17.3.1. Medidas generales

- El acceso al laboratorio está limitado a personal autorizado.
- El personal del laboratorio debe implicarse en el cumplimiento de las normas de seguridad.
- Las puertas de acceso al laboratorio y al área de Micología debe estar debidamente marcada con la señalización internacional de riesgo biológico (Figura 17.1) y su nivel de contención biológica, que en el caso del área de Micología se corresponde con el nivel 2 (NST2). También se señalarán los congeladores y refrigeradores utilizados para guardar microorganismos de riesgo de tipo 2.
- Las puertas y ventanas deben permanecer cerradas para mantener la adecuada contención biológica.
- El laboratorio estará separado del pasillo de circulación por un vestíbulo.
- El laboratorio debe ser aireado regularmente. El aporte de aire nuevo será como mínimo de 60 m³ por persona y hora.
- Todas las superficies de trabajo se limpiarán y desinfectarán diariamente y siempre que se produzca un derrame. Los residuos y muestras peligrosas que van a ser incinerados fuera del laboratorio deben ser transportados en contenedores cerrados, resistentes e impermeables, siguiendo las normas específicas para cada tipo de residuo (ver más adelante).
- El área del laboratorio debe permanecer limpia y



Figura 17.1. Señal de peligro biológico.

- ordenada.
- La Unidad deberá disponer de un lavabo para el lavado de las manos que funcionará presionando con el codo o con el pie.
- El transporte de muestras dentro o entre laboratorios se realizará de tal manera, que en caso de caída, no se produzcan salpicaduras. Lo recomendable es hacerlo en cajas herméticas o neveras transportables. Estas deberán ser rígidas y resistentes a los golpes, disponer de materiales absorbentes en su interior y de fácil desinfección. Deberán estar rotuladas de forma oportuna y no podrán utilizarse para otros fines. Bajo ningún concepto se transportarán muestras en mano.
- Todo el personal debe poner especial cuidado en evitar el contacto de la piel con materiales potencialmente infecciosos. Para ello deben usarse guantes cuando se manipulen muestras o cultivos que contengan posibles patógenos fúngicos. Los guantes siempre serán desechados antes de salir del área de trabajo. Jamás se saldrá de la misma con los guantes puestos, ni se cogirá con ellos el teléfono, las peticiones, etc.
- Inmediatamente después de quitarse los guantes, se realizará un lavado de manos.
- Se usarán gafas protectoras y mascarillas faciales si existe riesgo de salpicaduras o aerosoles.
- Los derrames y accidentes serán informados inmediatamente al supervisor o jefe del laboratorio y se harán constar por escrito.
- Está rigurosamente prohibido pipetear con la boca.
- En la zona de trabajo no debe colocarse material de escritorio ni libros ya que el papel contaminado es de muy difícil esterilización.
- Es necesario disponer de autoclave.
- Las centrífugas deben ser de cierre hermético

(sistema *aerosol free*) y con tubos de seguridad.

17.3.2. Higiene

- El personal con el cabello largo debe llevarlo recogido.
- Comer, beber, fumar y aplicarse cosméticos está formalmente prohibido en el área de trabajo del laboratorio, así como el almacenamiento de comida o bebida.
- El personal debe lavarse las manos frecuentemente durante las actividades rutinarias, tras acabar la jornada laboral y siempre antes de abandonar el laboratorio. Se utilizará jabón anti-séptico y el secado se realizará con papel.
- Las heridas y cortes en las manos, si se producen el laboratorio, se comunicarán al responsable de la Sección así como al supervisor, que lo registrará haciendo constar todas las circunstancias. Las heridas serán convenientemente vendadas antes de ponerse los guantes.

17.3.3. Objetos punzantes y cortantes

- Las agujas, jeringas y bisturís, deben ser desechados exclusivamente en contenedores especiales diseñados para este propósito.

17.4. Técnicas de laboratorio en el área de Micología

- Todos los cultivos de hongos (especialmente los hongos con micelio aéreo) y muestras clínicas serán manejadas en una cabina de bioseguridad de clase II, para evitar la contaminación del laboratorio y del personal. Es permisible el manejo de cultivos de levaduras en la mesa de trabajo del laboratorio aunque siempre tratados como material infeccioso.
- Las placas con medios de cultivo para hongos deben ser selladas, para evitar su apertura accidental mediante cinta adhesiva permeable al oxígeno que no pierda esta propiedad en una estufa de incubación con ambiente húmedo (Scotch N° 483).
- En caso de utilización de medios de cultivo en tubo, estos deberán disponer de tapón de rosca de seguridad.

- En ambos casos su apertura sólo deberá hacerse en cabina de bioseguridad de clase II.
- En el caso de trabajar con aislamientos fúngicos dimórficos conocidos, las precauciones a seguir son sencillas si se dispone de condiciones de nivel de contención 3. En su defecto, sellar las placas con cinta adhesiva y reservar su apertura sólo en cabina de bioseguridad de clase II. No hacer preparaciones con cinta adhesiva para su observación microscópica, ni cultivos en porta. Lo aconsejable en este caso es separar una porción de la colonia, para su montaje en porta, en la cabina de bioseguridad de clase II.
- En ningún caso debe descartarse la posibilidad que se trate de un hongo dimórfico sistémico. Por ejemplo, *Coccidioides immitis* es a menudo considerado hongo de crecimiento rápido no productor de una masa micelial pigmentada; sin embargo, en algunos casos puede producir una pigmentación rosada o verdosa. Sus arthroconidias pueden estar ausentes en su crecimiento en ciertos medios de cultivo, como en aquellos que contienen cicloheximida, pero sí están presentes en otro tipo de medios de cultivo.

Por otro lado, la ausencia de macroconidias características de *Histoplasma capsulatum*, tampoco debe descartar la posibilidad que se trate de este tipo de hongo, dado que pueden ser de aparición tardía (además, se cree que probablemente son las microconidias las responsables de la infección por transmisión aérea). Todo crecimiento de hongo filamentoso en medio con cicloheximida con hifas estériles, especialmente si son cortas, debe ser considerado con alta capacidad infectiva hasta que no se demuestre lo contrario.

- El mayor problema de seguridad en el laboratorio al trabajar con hongos dimórficos no lo constituye el área de Micología, donde probablemente se trabaja siguiendo una pautas de bioseguridad adecuadas, sino las otras áreas del laboratorio donde se procesará la misma muestra para estudio bacteriológico. En este caso pueden seguirse dos tipos de conductas:

a) Cualquier medio de cultivo que deba incubarse más de tres días debe ser sellado y no abierto sin antes inspeccionar la presencia de formas miceliales.

b) Ante la apertura de forma accidental de cualquier placa con la presencia de un hongo filamentoso, esta debe ser rápidamente cerrada y manipulada en una campana de bioseguridad para su examen microscópico. La presencia o ausencia de estructuras conidiales en el momento de la exposición debe ser tenida en cuenta para poder tomar medidas médicas sobre el incidente.

El transporte de este tipo de hongos dimórficos sistémicos debe realizarse bajo las condiciones estrictas descritas para los mismos (ver más adelante), ya que los conidios infecciosos pueden formarse

durante su transporte y constituir un riesgo para quien lo transporta o recibe el aislamiento.

- Existen microorganismos que, a pesar de ser dimórficos, no suelen constituir un riesgo infeccioso por medio de aerosoles como es el caso de *Sporothrix schenckii*; sin embargo, es un patógeno potencial tras inoculación subcutánea o en contacto con mucosa ocular. En este caso concreto, al no constituir un riesgo infeccioso por vía aérea, podría ser procesado en un nivel de contención 2.

También se ha sugerido que los hongos dematiáceos pueden constituir riesgo de infección por vía respiratoria en su forma micelial, dada su capacidad infectiva, en pacientes inmunodeprimidos tras contacto con los mismos en la naturaleza.

A pesar de que la mayoría de los restantes hongos oportunistas y saprofitos, no parecen constituir un riesgo de infección para el personal de laboratorio inmunocompetente, la dispersión de las conidias en el laboratorio puede producir reacciones de tipo alérgico, así como contaminación de los medios de cultivo. Por tanto para proteger al trabajador como al resto del trabajo del laboratorio, deben evitarse grandes exposiciones al ambiente, abriendo tan sólo los medios de cultivo positivos en cabinas de bioseguridad clase II.

- El vertido de todo material infeccioso debe realizarse en recipientes identificados como contenedores de material infeccioso, para que puedan ser decontaminados apropiadamente.

17.5. Medidas de barrera primaria

Están constituidas por los equipos de protección personal y las cabinas de seguridad biológica [3].

17.5.1. Equipos o prendas de protección personal

A todo el personal que trabaje en una Unidad de Micología se aconseja respete las siguientes recomendaciones:

17.5.2. Cabinas de seguridad biológica

Son cámaras de circulación forzada que, según sus especificaciones y diseño, proporcionan diferentes niveles de protección. Es necesario distinguir entre las campanas de extracción de gases, las cabinas de flujo laminar y las cabinas de seguridad biológica.

La **campana de gases** o vitrina extractora de gases es un recinto ventilado que captura los humos y vapores procedentes de las manipulaciones de los productos químicos empleados en el laboratorio. Si bien constituye un equipo muy útil en la contención de riesgo químico, no ofrece protección alguna frente a riesgos biológicos.

Las **cabinas de flujo laminar** son recintos que emplean un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) barriendo la superficie de trabajo. El flujo de aire puede ser vertical u horizontal. Estas cabinas ofrecen protección únicamente al material que se maneja en su interior, pero nunca al operador por lo que no son recomendables para el trabajo con material biológico. Sin embargo, es un instrumento

Recomendaciones para la protección del personal de laboratorio:

- No se recomienda el uso de lentillas durante el trabajo en el laboratorio.
- Los guantes constituyen la medida de barrera más empleada para la protección de manos:
 - Las manos deben lavarse obligatoriamente al quitarse los guantes.
 - Sólo deben emplearse para protección contra riesgos biológicos y físicos (calor o frío), pero no para otras tareas (manejar volantes, teléfono, abrir puertas, etc.).
- La mascarilla sólo tiene utilidad para protección frente a polvo (partículas), aerosoles, gases y vapores químicos.
- La bata o pijama como vestuario de protección personal:
 - No debe salir fuera de su lugar de uso (cafetería, calle, etc.).
 - Nunca deben ser lavados fuera del recinto hospitalario.
 - No es aconsejable el empleo de ropa de calle que aumente la superficie corporal expuesta (pantalones cortos, sandalias, etc.).

útil en las denominadas “zonas limpias” como pueden ser las destinadas a vertido de medios de cultivo, preparación de reactivos que deban ser estériles, etc.

Las **cabinas de seguridad biológica (CSB)** son recintos ventilados diseñados para limitar al máximo el riesgo del personal del laboratorio expuesto a agentes infecciosos. Especialmente porque muchas de las actividades realizadas en el laboratorio implican la formación de aerosoles. Estos equipos tienen como objetivo principal proporcionar una zona de trabajo que minimice la probabilidad que una partícula transportada por el aire tienda a escapar hacia el exterior de la cabina pudiendo contaminar al operario y la zona que le rodea. Además, algunas de ellas, ofrecen protección al material que se manipula.

Las CSB disponen de dos sistemas que impiden la salida de contaminación: las barreras de aire y los filtros. La barrera de aire se crea permitiendo que este fluya en una sola dirección y a una velocidad constante dando lugar a una verdadera “cortina” de aire, sin turbulencias, que se conoce como flujo de aire laminar. Los filtros tienen como finalidad atrapar las partículas contenidas en este flujo de aire. Los que se emplean habitualmente son los filtros HEPA, que retiene con una eficacia del 99,9% partículas de hasta 0,3 micras de diámetro. Existen tres tipos de CSB: Clase I, Clase II y Clase III. A continuación se describen sus principales características, a excepción de las de Clase III, ya que estas no son necesarias en el área de Micología.

CSB Clase I

Son cámaras cerradas con una abertura al frente para permitir el acceso de los brazos del operario. El aire penetra por este frontal, atraviesa la zona de trabajo y todo él sale al exterior a través de un filtro HEPA. La velocidad de flujo del aire es de unos 4,4 m/s. Son apropiadas para manipular agentes biológicos de los grupos 1, 2 y 3. La mayor desventaja que presentan es que no proporcionan protección al material con el que se trabaja, no evitando que este se pueda contaminar. Por lo tanto se desaconseja su uso para el trabajo en el área de Micología.

CSB Clase II

Se diferencian de las anteriores porque, además de ofrecer protección al operario y a su entorno, ofrecen protección al producto frente a la contaminación. La superficie de trabajo está bañada por aire limpio que ha atravesado un filtro HEPA (Figura 17.2). La salida de aire se produce a través de otro filtro HEPA. Son válidas para el manejo de agentes biológicos de los grupos 1, 2 y 3, entre los que incluyen los hongos y por tanto las recomendadas para el laboratorio de Micología. Existen varios tipos de cabinas de Clase II según sus características

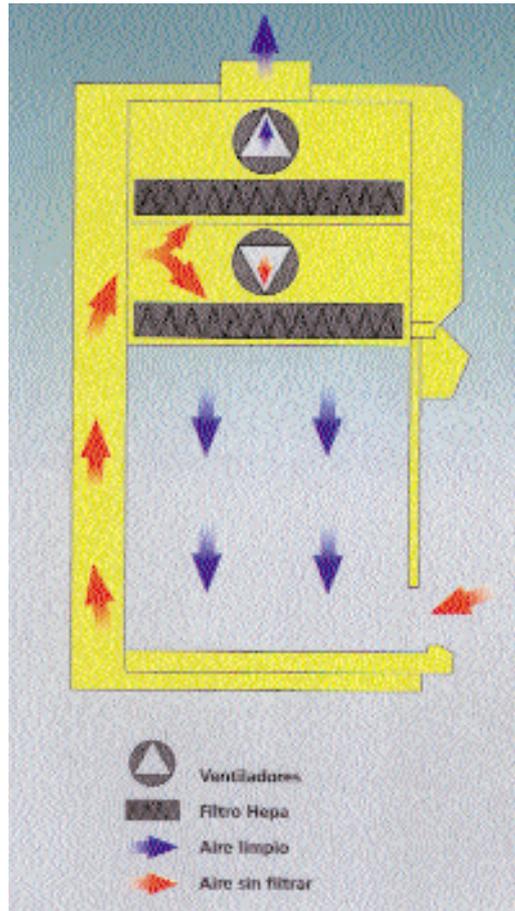


Figura 17.2. Cabina de seguridad biológica de clase II A.

de construcción, flujo de aire y sistema de extracción.

Clase II-A: Expulsa el aire filtrado al laboratorio o puede ser conducido fuera de él y recircula en un 70%.

Clase II-B1: Expulsa el aire filtrado al exterior del laboratorio y recircula el 30%.

Instalación de la CSB:

1. Debe situarse lo más lejos posible de las rejillas de aire acondicionado, campanas de gases, puertas y zonas de mucho tránsito de personal, que puedan interferir en el flujo laminar.
2. Las ventanas del laboratorio deben permanecer siempre cerradas.
3. Debe existir al menos 0,3 m entre la salida de aire de la cabina y el techo del laboratorio.
4. Se instalará sobre una superficie sólida y nunca móvil. Si es posible, en un recinto cerrado de acceso restringido.

Al iniciar el trabajo:

1. Poner en marcha la cabina durante 15-30 min.
2. Comprobar que el manómetro situado en la parte superior del frontal se estabilice e indique la presión adecuada.
3. Encender la luz fluorescente.
4. Limpiar la superficie de trabajo con un compuesto yodado como la povidona yodada (Betadine, Topionic, etc.) y enjuagar posteriormente para retirar los restos de yodo.
5. Antes y después de trabajar en una CSB debe realizarse lavado de manos y brazos.
6. Se aconseja emplear bata de manga larga y guantes de látex para minimizar el desplazamiento de la flora bacteriana cutánea hacia el interior del área de trabajo y proteger las manos y los brazos del operario de toda contaminación.

Durante la manipulación:

1. Colocar todo el material a utilizar en la zona de trabajo antes de empezar, situando el material contaminado en un extremo de la superficie de trabajo y el no contaminado en el extremo opuesto de la misma.
2. Se recomienda trabajar a unos 5-10 cm por encima de la superficie y alejado de los bordes de la misma, procurando no obstruir las rejillas de aire con materiales o residuos.
3. Una vez el trabajo haya comenzado y sea imprescindible la introducción de un nuevo material, se recomienda esperar de 5 a 10 min antes de reiniciar la tarea. Ello permite la estabilización del flujo del aire. Debe recordarse que cuanto más material se introduzca en la CSB, la probabilidad de provocar turbulencias de aire se incrementa.
4. Evitar al máximo las corrientes de aire ambientales provenientes de puertas o ventanas abiertas, movimientos de personas, sistemas de ventilación del laboratorio, etc. que perturben el flujo establecido en el interior de la CSB. Así mismo, deberían evitarse movimientos bruscos dentro de la CSB, con movimientos de brazos y manos lentos para impedir la formación de corrientes de aire que alteren el flujo laminar.
5. Debe evitarse el empleo de mecheros Bunsen, cuya llama crea turbulencias en el flujo, además de dañar potencialmente el filtro HEPA. Cuando se precise el empleo de asas o espátula micológica de níctrom o platino es aconsejable el incinerador eléctrico o bien el empleo de asas desechables.
6. Si se produce un vertido accidental de material biológico se recogerá inmediatamente, descontaminando la superficie de trabajo y todo el material que en ese momento exista dentro de la CSB.
7. No se empleará nunca una CSB cuando esté sonando alguna de sus alarmas.

Al finalizar el trabajo:

1. Limpiar el exterior del material que se haya contaminado.
2. Vaciar la CSB por completo de cualquier material.
3. Limpiar y descontaminar la superficie de trabajo con un jabón desinfectante y después con un compuesto yodado (povidona yodada). La limpieza tiene por objeto eliminar la suciedad que se halle adherida a la superficie (que sirve de soporte a los microorganismos) y la materia orgánica, contribuyendo de forma decisiva a la eficacia de la descontaminación posterior con el yodóforo. A fin de evitar la coloración residual de los compuestos yodóforos en las superficies, estas deben enjuagarse con agua.
4. Dejar en marcha la CSB durante un tiempo prudencial (10-15 min).
5. Cerrar la apertura frontal.
6. La luz ultravioleta, presente en algunas CSB, tiene poco poder de penetración por lo que su capacidad descontaminante es muy limitada, además de constituir una fuente de accidentes por exposición, por lo que debería evitarse su empleo.
7. Nunca se debe utilizar la CBS como almacén transitorio de equipo o material de laboratorio para evitar el acúmulo de polvo.
8. Evitar introducir en la CSB materiales que emitan partículas con facilidad, como algodón, papel, madera, cartón, lápices, etc.

Mantenimiento:

1. Semanalmente conviene levantar la superficie de trabajo para limpiar y descontaminar por debajo de ella.
2. Semanalmente, con un paño mojado, se limpiarán todas las superficies exteriores con objeto de eliminar el polvo acumulado.
3. Mensualmente se revisará el estado de las válvulas interiores con que vaya equipada.
4. Anualmente se certificará por una entidad cualificada.
5. Se llevará a cabo una desinfección completa en las siguientes situaciones:
 - a. En caso de que se haya producido un vertido importante
 - b. Antes de cualquier reparación
 - c. Antes de iniciar los controles periódicos
 - d. Siempre que se cambie el programa de trabajo
 - e. Cuando se substituyan los filtros HEPA
 - f. Cuando se cambie de lugar, incluso si el cambio es dentro del mismo laboratorio.
6. La desinfección completa se realizará con vapores de formaldehído por personal debidamente entrenado y equipado con prendas de protección adecuadas.

Clase II-B2: Expulsa el aire filtrado al exterior del laboratorio y no recircula.

Clase II-B3: Expulsa el aire filtrado al exterior del laboratorio y recircula el 70%.

Hasta el momento, no existe en España ninguna legislación relativa a los requisitos que deban cumplir las CSB. La práctica más habitual consiste en exigir a los proveedores correspondientes la declaración de conformidad, bien con la norma británica BS 3928 o con la estadounidense NSF 49.

Las recomendaciones generales son las siguientes:

Tabla 17.2. Propiedades de algunos desinfectantes sobre microorganismos fúngicos [5].

Tipo de desinfectante	Grado de acción desinfectante
Fenólicos	+++
Hipocloritos	+
Alcoholes	-
Formaldehídos	+++
Glutaraldehídos	+++
Yodóforos	+++
Amonios cuaternarios	+

+++ buena; ++ media; + débil; - ninguna

Mesa de trabajo o poyata de laboratorio:

- La limpieza debe ser diaria al finalizar el trabajo o cuando se produzca un derramamiento.
- Para ello puede emplearse hipoclorito al 0,5%, que se consigue diluyendo la lejía estándar al 1% con agua.

Cabina de bioseguridad:

- Debe procederse a su limpieza con compuesto detergente líquido y papel para realizar el arrastre de materia orgánica que pueda existir.
- A continuación puede emplearse compuestos de yodo de alta eficacia frente a los elementos fúngicos. Dada su acción colorante y corrosiva sobre los metales, es preferible usar los derivados yodóforos como la povidona yodada (polivinil-pirrolidona) diluida al 2%, que es de acción inmediata. A los pocos minutos es recomendable enjuagar con agua para eliminar la coloración residual. Es preferible no utilizar etanol al 70% para eliminar los restos de yodo dado que en las CSB en las que recircule el aire se desaconseja su uso por su volatilidad.

Estufas:

- Se procederá a su limpieza y desinfección mediante detergente líquido y posterior aplicación de povidona yodada al 2%. En este caso, para eliminar la coloración residual del yodóforo puede emplearse etanol al 70%.
- En aquellos casos en que se observe un incremento de las contaminaciones en los medios de cultivo por hongos ambientales, especialmente *Aspergillus* spp., puede procederse, tras la limpieza y desinfección ya comentada, a la aplicación de un compuesto fenólico en dilución acuosa a niveles de entre 400 y 1300 ppm (fenol en una dilución 1:1000). A diferencia de los compuestos yodados, este compuesto tiene un efecto residual prolongado.

Derrame accidental:

- Cubrir con un papel de filtro la zona afectada. Ello permite delimitar con claridad la extensión de superficie afectada por el derrame.
- Verter encima del área afectada, con cuidado, hipoclorito a una concentración superior que la empleada para limpieza (lejía casera diluida al 1:10). Dejar actuar 20 min. También puede emplearse compuestos de yodo.
- Con guantes retirar los desechos en un contenedor para material infeccioso.
- Enjuagar para evitar coloración residual.

17.6. Agentes desinfectantes

En la [Tabla 17.2](#) se describen las propiedades de algunos desinfectantes frente a los microorganismos fúngicos [5,6].

Basándose en ello, los de mayor utilidad en el área de Micología son los siguientes:

Hipoclorito sódico

Los desinfectantes que contienen hipoclorito sódico (lejía) son potentes agentes oxidantes que liberan Cl_2 (gas cloro). La exposición al cloro produce irritación de mucosas incluida la del tracto respiratorio superior y piel. Debe emplearse bata y guantes resistentes.

Compuestos cuaternarios

Incorporados a múltiples soluciones desinfectantes, son generalmente menos cáusticos que otros desinfectantes. Sin embargo, debe tenerse cuidado con su manipulación ya que es conocida su capacidad para irritar la piel y producir alergias.

Formaldehído y glutaraldehído

Son compuestos altamente tóxicos. El formaldehído puede estar presente en el laboratorio en forma gaseosa, líquida (solución de formalina) o sólida (paraformaldehído). Puede producir, tras exposición aguda, irritaciones oculares y del tracto respiratorio superior; y tras exposición crónica, dermatitis, alergias cutáneas y respiratorias. Se sospecha además de su poder carcinogénico en humanos. Ambos compuestos deben ser sólo manipulados en campana de gases y con protectores de ojos impermeables.

17.7.2. Colorantes

Son utilizados en la mayoría de casos en cantidades muy pequeñas. Sin embargo, deben tomarse precauciones para evitar su exposición especialmente a los derivados de la acridina, como el naranja de acridina, que son carcinogénicos. El bromuro de etidio es un poderoso mutágeno de efecto acumulativo utilizado en técnicas de biología molecular. Debe evitarse estrictamente el contacto con estas sustancias mediante el empleo de guantes.

17.7. Normas de protección frente a productos químicos

Una forma rápida y fiable para identificar el riesgo de una sustancia o preparado químico es su etiqueta. En ella, el fabricante o proveedor, de acuerdo con la legislación existente, debe identificar las sustancias peligrosas que lo componen e informar de los riesgos (frases R) y los consejos de prudencia (frases S). Además, junto al producto, debe adjuntarse la ficha de datos de seguridad en la que se amplía la información y se detallan los riesgos de su utilización y las medidas de seguridad a adoptar [7].

La exposición a los compuestos químicos puede producir efectos agudos o crónicos y la aparición de enfermedades. Estos efectos son función directa de la toxicidad del agente químico, la dosis absorbida y la vía de entrada al organismo: por inhalación, dérmica (mucosas y piel intacta), digestiva o percutánea.

El correcto almacenamiento de los compuestos químicos constituye la primera medida de actuación, separando aquellas familias de productos incompatibles. Se separarán ácidos de bases, oxidantes de inflamables, sustancias cancerígenas, etc. Los envases más pesados así como los ácidos y las bases fuertes se colocarán en los estantes inferiores. Los productos peroxidables (éter etílico, éter isopropílico, etc.) pueden provocar detonaciones por contacto con el aire o incluso por choque o fricción, por ello no es aconsejable almacenarlos una vez abiertos más de 6 meses, a no ser que contengan un inhibidor eficaz.

Entre los compuestos más empleados en el área de Micología figuran:

17.7.1. Agentes desinfectantes

17.8.1. Gestión de residuos infecciosos

17.8. Gestión de residuos

Residuos líquidos

La mayoría de laboratorios someten a los residuos líquidos a un tratamiento de esterilización por autoclave.

Residuos sólidos

Sus formas más frecuentes de tratamiento son la incineración y la esterilización por autoclave. En el primer caso deben depositarse en recipientes rígidos que serán transportados de forma regulada por empresas autorizadas para su incineración. Sin embargo, la esterilización por autoclave es la manera más común de tratar este tipo de residuos en el propio laboratorio. Debe tenerse en cuenta que los programas para materiales limpios no sirven para los desechos, siendo recomendable prolongar el tiempo y aumentar la presión del proceso de autoclavado en estos casos. La utilización de indicadores químicos y biológicos (suspensiones de esporas de *Bacillus*) no es suficiente para el control de la eficacia del proceso. Algunos autores recomiendan no utilizarlas para evitar una falsa seguridad. Alternativamente, consideran más apropiado el control riguroso sistemático de cada proceso (registro de presión y temperatura) y un mantenimiento apropiado del autoclave.

Objetos punzantes y cortantes

Dado que constituyen un claro riesgo de inoculación accidental deben depositarse en recipientes específicos que sean resistentes a la punción y con cierre seguro. Una vez llenos, se depositan en los recipientes rígidos utilizados para los residuos sólidos.

17.8.2. Gestión de residuos químicos

Ante todo se debería disponer de una lista que identificara todos aquellos residuos peligrosos que sean susceptibles de atención, incluidos aquellos que formen parte de reactivos comerciales. En general pueden eliminarse después de un sencillo tratamiento en el propio laboratorio. Cuando no es posible debe consultarse a las autoridades locales para su vertido controlado. Se recomienda disponer de material absorbente inerte específico para productos químicos. En algunos casos concretos se procederá de la manera siguiente:

Ácidos inorgánicos

Salvo roturas accidentales, no suele ser frecuente tener que eliminar ácidos concentrados (HCl,

HNO₃, H₂SO₄, etc.), aunque sí soluciones diluidas de los mismos. Como norma general no debe eliminarse directamente aquellas soluciones cuya concentración sea superior a 1N. Los ácidos más concentrados se diluyen en agua al 1:5 (especial precaución con el ácido sulfúrico), se neutralizan a pH 6,8 con soluciones de hidróxido sódico y se vuelven a diluir al 1:10 en agua para poder ser eliminados por el desagüe. Las soluciones más diluidas se neutralizan con sosa y se diluyen en agua antes de eliminarse.

Bases inorgánicas, sales básicas y diluciones básicas

Su gestión es parecida a la aplicada en los ácidos. Las bases y sales básicas se neutralizan con ácido sulfúrico diluido. Si son muy concentradas, se diluyen previamente en agua al 1:5. Una vez neutralizadas, se vuelven a diluir en agua (1:10) y se eliminan.

Fenoles

El fenol y sus derivados son irritantes y tóxicos. No deben eliminarse a través de los desagües, ni tan siquiera diluidos. El procesamiento de destrucción química no está al alcance de la mayoría de laboratorios. Lo más aconsejable es separarlos en recipientes específicos y transferirlos a un gestor autorizado de residuos.

Azida sódica

Está presente en muchos reactivos comerciales como conservante. Nunca debe eliminarse directamente por desagües de plomo dado que forma derivados altamente explosivos. Es un tóxico muy potente y agente mutágeno. Es conveniente contactar con las autoridades locales autorizadas para conocer las normas específicas, ya que la destrucción química con nitrato sódico no resulta práctica en la mayoría de laboratorios.

Aldehídos, cetonas y disolventes orgánicos

El formaldehído es el residuo generado en el laboratorio más común dentro de este grupo. No debe ser eliminado directamente por el desagüe. Conviene almacenarlo en recipientes seguros para poderlo eliminar de manera controlada. La destrucción con permanganato potásico es compleja. La eliminación controlada también es aconsejable para los diversos disolventes orgánicos (acetona, cloroformo, xileno y otros derivados bencénicos, etc.).

Bromuro de etidio

Es un mutágeno poderoso de efecto acumulativo utilizado en técnicas de biología molecular. Deben seguirse de forma estricta los procedimientos de manipulación que eviten su contacto (guantes, etc.). Los geles teñidos con bromuro de etidio no deben eliminarse como una basura convencional, sino a través de los sistemas de eliminación de mutágenos y citostáticos propios del centro hospitalario. Las soluciones tampón de electroforesis que contienen bromuro de etidio tampoco deben eliminarse por los desagües. Deberían tratarse con carbón activo (100 mg por cada 100 ml de solución), filtrar la solución formada a través de un filtro de papel y depositarlo todo en el cubo de eliminación de citostáticos. Las superficies pueden descontaminarse aplicando una papilla de carbón activo que se dejará actuar durante un tiempo, depositándose posteriormente en el cubo de eliminación de citostáticos.

Colorantes

Recomendaciones para la manipulación de residuos:

- Los recipientes para desechar los residuos de riesgo en el área de trabajo deben ser rígidos, de volumen inferior a 60 l, impermeables y resistentes a ácidos y álcalis, de cierre hermético y homologados para ser incinerados.
- El almacenamiento y transporte deberá hacerse en condiciones seguras. Deben existir zonas acotadas para su almacenamiento intermedio especialmente si los residuos son de riesgo, no superando en ningún caso las 24 h una vez se ha cerrado.
- Para los residuos no específicos se utilizarán bolsas de color diferenciadas.
- En el caso de objetos cortantes o punzantes deberán utilizarse recipientes rígidos resistentes a la perforación cuyo volumen no supere los 2 l.

No deberían ser eliminados directamente por

los desagües. Se recomienda efectuar las tinciones en cubetas que drenen sobre botellas o bidones que se entregarán, una vez llenos, al gestor de residuos autorizado. Estas medidas deben ser seguidas de manera rigurosa en el caso de la tinción de auramina. El naranja de acridina es también un compuesto mutágeno, por lo que se recomienda almacenarlo en recipientes separados.

Metales pesados, mercurio y compuestos organomercuriales

La rotura de termómetros y manómetros puede ser una causa de exposición al mercurio. Se recomienda recoger los restos más visibles y depositarlos en un recipiente cerrado. Los menos visibles pueden recogerse con ayuda de polvo absorbente o azufre y guardar el conjunto en otro envase. Los residuos deben ser almacenados y eliminados de forma controlada.

17.9. Normas de seguridad en el almacenamiento, transporte y envío de material biológico

17.9.1. Almacenamiento

El material infeccioso debe almacenarse en zonas de acceso restringido para minimizar la posibilidad de contaminación del personal y del ambiente.

El sistema básico de embalaje estará compuesto por:

1. Recipiente primario a prueba de filtraciones, etiquetado, que contenga la muestra. El recipiente debe envolverse con material absorbente.
2. Recipiente secundario a prueba de filtraciones, que encierra y protege el recipiente primario. En él se pueden colocar varios recipientes primarios, colocando suficiente material absorbente para evitar choques entre ellos. Los formularios, cartas y otras informaciones de identificación de la muestra deben colocarse pegados con cinta adhesiva en el exterior de este recipiente.
3. Recipiente externo de envío donde se coloca el recipiente secundario para protegerlo de elementos externos como daño físico y agua.

17.9.2. Transporte y envío

No existen regulaciones ni recomendaciones específicas para el transporte seguro de microorganismos patógenos. Sin embargo, si ampliamos la definición y los consideramos como “sustancias infecciosas”, hay varios documentos internacionales

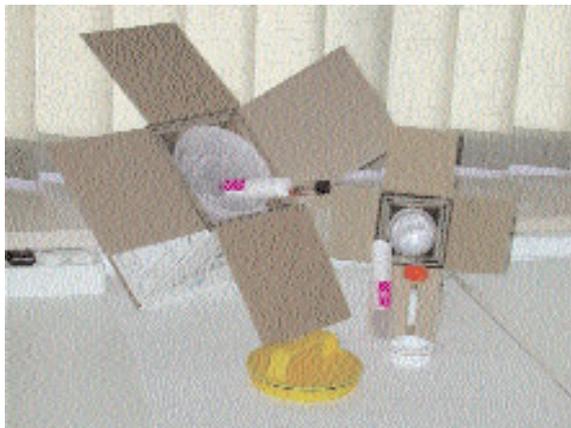


Figura 17.3. Sistema de embalaje para transporte aéreo de material biológico.



Figura 17.4. Sistema de embalaje para transporte terrestre de material biológico.

relacionados con el tema, como los de la Unión Postal Universal (UPU), la Organización Internacional de Aviación (OIA) y la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA).

Estas directivas y, en general, todos los documentos internacionales relacionados están basados en texto único común: Recomendaciones del Comité de Expertos de las Naciones Unidas para el transporte de artículos peligrosos.

Estas recomendaciones clasifican las mercancías infecciosas en varias clases, dos de las cuales están relacionadas con los microorganismos patógenos: clase 6.2 (sustancias infecciosas) y clase 9 (sustancias peligrosas misceláneas y artículos).

Los embalajes para transporte aéreo (Figura 17.3) presentan algunas diferencias respecto a los transportados por vía terrestre (Figura 17.4), ya que deben asegurar la protección frente a presiones muy altas (Carburos Metálicos, Embalajes y Mercancías Peligrosas, Esdesla, Sarstedt). En los vuelos internacionales está estrictamente prohibido que los pasajeros transporten sustancias infecciosas.

17.10. Normas de seguridad en caso de accidente

17.10.1. Riesgos no biológicos

Químicos

Pueden deberse a inhalación accidental por no usar cámara de gases, a deglución por pipetear indebidamente o por contacto (salpicaduras de ácidos, álcalis, sustancias tóxicas o cancerígenas). En este último caso la ducha de seguridad puede ser de ayuda y, en cualquier caso, se debe acudir al Servicio de Urgencias. Resulta de gran utilidad consultar la ficha de seguridad del producto causante del accidente y las notas técnicas que se encuentran disponibles en las páginas web del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales [7,8].

Físicos, eléctricos y fuego

Los accidentes físicos más frecuentes son las heridas causadas por objetos punzantes o cortantes y las quemaduras por vapor de autoclave. En los casos que no puedan solucionarse con las medidas de primeros auxilios se acudirá al Servicio de Urgencias.

En los accidentes eléctricos jamás se intentará apagar al afectado de la fuente eléctrica con

las manos, sino a través de un objeto no conductor, procediendo previamente al corte del suministro eléctrico.

su sofocación sin extintor, dado que la salida de CO₂ a alta presión puede producir salpicaduras del líquido inflamable que está ardiendo.

En caso de fuego su extinción se llevará acabo mediante extintores de CO₂. Si se tratara de líquidos que ardieran en su superficie, se procurará

17.10.2. Riesgos biológicos

Tabla 17.3. Infecciones fúngicas adquiridas en el laboratorio [9].

Hongo	Inhalación	Inoculación transcutánea	Piel	Conjuntiva	Contacto con animal infectado
<i>Blastomyces dermatidis</i>	X	X			
<i>Coccidioides immitis</i>	X	X			
<i>Cryptococcus neoformans</i>		X			
<i>Histoplasma capsulatum</i>	X	X			
<i>Penicillium marneffeii</i>	X	X			
<i>Sporothrix schenckii</i>		X	X	X	
Dermatofitos					X

Referencias

1. Warnock DW. Mycotic agents of human disease. In: Fleming DO, Hunt DL (Eds.) Biological safety principles and practices. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 2000: 111-120.
2. Collins CH. Laboratory-acquired infections. History, incidence, causes and prevention. Oxford, Butterworth-Heinemann, 1993.
3. Loza E, Alomar P, Bernal A, *et al.*. Seguridad en el Laboratorio de Microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid, SEIMC, 1999.
4. Protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Real Decreto 664/1997, de 12 de Mayo. B.O.E. nº 124, de 24 de mayo y adaptación contenida en la Orden de 25 de marzo de 1998.
5. Block SS. Desinfection, sterilization, and preservation. Pennsylvania, Lea & Febiger, 1991.
6. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 147-179.
7. Fichas de seguridad química del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales: <http://www.mtas.es/insht/ipcsnspn/spanish.htm>
8. Notas técnicas del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales: http://www.mtas.es/insht/information/Ind_temntp.htm
9. Sewell DL. Laboratory-associated infections and biosafety. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 389-405.