

**EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**



**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK  
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS**

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE  
LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD – UISEK 2021”**

Realizado por:

**Dayssi Dayana Collaguaso Catagña**

Director del proyecto:

**Dr. Lino Arisqueta Herranz, Ph.D.**

Como requisito para la obtención del título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

Quito 02 de Marzo 2022

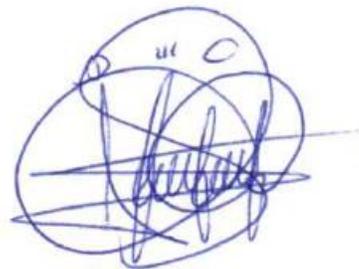
**EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

## DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, DAYSSI DAYANA COLLAGUASO CATAGÑA, con cédula de identidad 210079938-2, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



Dayssi Dayana Collaguaso Catagña

C.I. 210079938-2

**EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

**“EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE  
LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD-UISEK 2021”**

Realizado por:

**DAYSSI DAYANA COLLAGUASO CATAGÑA**

como Requisito para la Obtención del Título de: I

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

ha sido dirigido por el profesor

**LINO ARISQUETA HERRANZ**

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



Dr. Lino Arisqueta Herranz

**DIRECTOR**

**EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**LOS PROFESORES INFORMANTES**

Los profesores informantes:

**JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ**

**ALBERTO AGUIRRE**

Después de revisar el trabajo presentado, lo han calificado como apto para su defensa  
oral ante el tribunal examinador



PhD. José Rubén Ramírez

REVISOR



PhD. Alberto Aguirre

REVISOR

Quito, 02 de Marzo 2022

# **EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

## **DEDICATORIA**

Mi tesis se la dedico a mis padres por brindarme su apoyo y esfuerzo en mis estudios durante toda la carrera hasta llegar a ser una profesional. Todos mis logros se los debo a ellos que nunca me dejaron sola en cada paso que doy para no rendirme y alcanzar mis metas depositando toda su confianza en mí.

Agradezco a Dios por brindarme salud y vida para seguir adelante disfrutando de cada día nuevos conocimientos.

A todos mis profesores les agradezco por brindarme todos sus conocimientos.

# **EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, agradezco a Dios por brindarme salud y vida para seguir adelante disfrutando de cada día y de nuevos conocimientos. Por darles vida a mis padres para que compartamos de este bello momento de ser toda una profesional.

A todos mis profesores les agradezco por brindarme todos sus conocimientos y enseñanzas en cada una de las etapas, en especial a mi Tutor Lino Arisqueta.

**EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

02/03/2022

Para ser enviado:

To be submitted:

**“EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE  
LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD – UISEK 2021”**

Dayssi Collaguaso Catagña<sup>1</sup>, Lino Arisqueta<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Quito,

Ecuador. 02/03/2022

\*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: Ph.D. Lino Arisqueta,

Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Quito, Ecuador.

Teléfono: +593- 983104230;

email: lino.arisqueta@uisek.edu.ec

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

## RESUMEN

En la actualidad el campo de la biotecnológica está ganando su espacio y postura, pues cada vez se utiliza más aplicaciones tecnológicas que se los emplean en diferentes procesos para la obtención de productos, siguiendo sus respectivos protocolos de bioseguridad en los laboratorios y evitar un riesgo de contaminación por microorganismos.

El presente estudio tiene como finalidad el aislamiento de los microorganismos circulantes dentro del Laboratorio de Investigación de FICA, para su muestreo se seleccionaron dos medios de cultivos para bacterias (Agar Nutritivo) y hongos (Agar Sabouraud) en placas Petri, se realizaron caracterizaciones cualitativas con las técnicas de identificación como: pruebas bioquímicas, morfológicas, fenotípicas, MALDI- TOF, obteniendo como resultados positivos 14 bacterias distintas; PCR, secuenciación Sanger y el BLAST, dando como resultado positivo para 4 hongos distintos.

Estos microorganismos son considerados como organismos no patógenos, oportunistas, ambientales, humanos y parte de la flora, su identificación nos ayuda a la toma de decisiones para mejorar los laboratorios con adecuaciones en su estructura y crear un programa de desinfección, evitando con estas medidas de prevención posibles riesgos a la salud de quienes ocupan el laboratorio con fines investigativos tanto como el alumnado y la docencia.

**Palabras clave:** PCR, MALDI-TOF, identificación, morfología, cuantificación, genotipo, fenotipo, medio de cultivo.

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

## ABSTRACT

Currently, the field of biotechnology is gaining its space and position, since more and more technological applications are used in different processes to obtain products, following their respective biosafety protocols in laboratories and avoiding the risk of contamination. contamination by microorganisms.

The purpose of this study is to isolate the circulating microorganisms within the FICA Research Laboratory, for sampling two culture media for bacteria (Nutritive Agar) and fungi (Sabouraud Agar) were selected in Petri dishes, qualitative characterizations were carried out with techniques of identification such as: biochemical, morphological, phenotypic, MALDI-TOF tests, obtaining 14 different bacteria as positive results; PCR, Sanger sequencing and BLAST, giving positive results for 4 different fungi.

These microorganisms are considered as non-pathogenic, opportunistic, environmental, human organisms and part of the flora, their identification helps us make decisions to improve laboratories with adjustments in their structure and create a disinfection program, avoiding possible prevention measures with these risks. to the health of those who occupy the laboratory for research purposes, as well as students and teachers.

**Keywords:** PCR, MALDI-TOF, identification, morphology, quantification, genotype, phenotype, culture medium.

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

## 1. INTRODUCCIÓN

El riesgo se define como la función de la probabilidad de un evento adverso y las consecuencias que ese evento adverso tuviera (riesgo = probabilidad x consecuencia). En el caso concreto del riesgo microbiológico, éste se define como la probabilidad de que un microorganismo no deseado contamine un área exclusiva de interés (FAO, 2006; Vázquez et al., 2019) afectando a procesos (productivos, investigativos, diagnósticos, etc.) o al personal al cargo de los mismos en el caso de microorganismos infecciosos.

La evaluación del riesgo microbiológico comienza por la identificación de los microorganismos susceptibles de producir la contaminación del espacio o el personal y la identificación de los procesos o actividades más susceptibles de verse afectados por los mismos (Vázquez et al., 2019). Tras este paso, se evalúan escenarios donde se consideran actividades específicas y la involucración de microorganismos específicos (entre aquellos identificados como posible riesgo) en los mismos. Después de esto, se evalúa el riesgo propiamente dicho, es decir, la probabilidad de cada uno de los escenarios analizados y sus posibles consecuencias. En este paso también se determina si el riesgo se considera aceptable o inaceptable (en el caso que nos ocupa, no es lo mismo, por ejemplo, que se contamine un cultivo celular, a que se produzca una enfermedad grave en los estudiantes o investigadores/docentes de la UISEK) y se trata de priorizar los distintos riesgos asociados a los escenarios. Finalmente, se diseñan estrategias de mitigación de los riesgos mediante implementación de barreras primarias (físicas, como mascarillas, guantes, campanas de flujo, etc.) y secundarias (diseño de espacios separados para actividades concretas,

## **EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

sistemas de ventilación, entradas restringidas, etc.). En este último paso, también pueden rediseñarse las actividades y procesos para minimizar el riesgo.

Actualmente la vigilancia de los laboratorios es una tarea planificada que se ejecuta periódicamente por profesionales capacitados, a menudo mediante subcontrata con una empresa acreditada, al igual que se hace con la gestión de residuos en los laboratorios (Raquel Terragno et al., 2013). Los laboratorios son catalogados como sistemas complejos que implican multiplicidad de procesos y actividades, así como de personal. Por ese motivo, en ellos existe un alto riesgo de exposición a agentes nocivos, ya sean éstos químicos o biológicos (Bolaño et al., 2019). La complejidad exige una buena integración de las partes y una planificación imbricada en un sistema de gestión de la calidad que examine todo el sistema. Esto último es importante, porque si el diseño de todos los procesos no es el adecuado, será muy difícil minimizar los riesgos por mucha vigilancia que se realice (Manual de Gestión de Calidad en el Laboratorio, OMS, 2016)

Uno de los métodos de caracterización microbiológica (primer paso en la evaluación del riesgo) para la detección de microorganismos susceptibles de afectar a los procesos y actividades, o al personal que trabaja en el laboratorio, es el muestreo programado (Carlos et al., n.d.) empleado en la presente investigación. Para ello, pueden colocarse placas Petri con medios de cultivo sólidos apropiados para el crecimiento de los distintos microorganismos (bacterias y hongos en el caso que nos ocupa) en lugares estratégicos del laboratorio de manera que se pueda tener una idea de los que circulan en el ambiente. Otra estrategia empleada es el análisis periódico de los filtros de los sistemas de ventilación ya que, al estar diseñados para atrapar microorganismos, son un buen referente para la identificación del riesgo microbiológico. También pueden realizarse frotis de

## EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

superficies antes y después de aplicar métodos de limpieza y/o desinfección, lo que permite, además, evaluar la efectividad de estos últimos.

La caracterización de los microorganismos puede ser de tipo cualitativo, en el que únicamente se identifican los microorganismos o puede ser de tipo cuantitativo, donde además se intenta establecer cual es el número o concentración de los microorganismos circulantes (Carlos et al., n.d.).

Para la identificación de microorganismos se pueden emplear métodos fenotípicos (características metabólicas o microscópicas) (Christopher P. Austin, 2022) o métodos moleculares o genotípicos basados en el análisis del ADN. Las bacterias pueden ser fácilmente identificadas en base a su fenotipo mediante una batería de pruebas bioquímicas (Antonio & Nieto, n.d.) que pueden realizarse mediante sistemas automatizados como Vitek<sup>®</sup>, o de manera manual realizando las pruebas de una en una. En la FICA de la UISEK no disponemos de sistemas automatizados por lo que únicamente podemos recurrir a sistemas manuales. Sin embargo, realizar manualmente todas las pruebas que requiere la identificación fenotípica de una bacteria a nivel de género y especie es muy laborioso y para un laboratorio docente muy costoso en medios y reactivos, que siempre deben ser frescos si se quiere obtener resultados confiables.

Además, de las clásicas pruebas bioquímicas, existen pruebas fenotípicas para la identificación de bacterias basadas en el análisis comparativo del proteoma de las mismas. Los perfiles de proteína obtenidos mediante espectrometría de masas MALDI – TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*) se pueden comparar con los de las bases de datos de las plataformas comerciales que ofrecen estos equipamientos. Es muy rápido y barato y ofrece

## EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

muy buenos resultados si el microorganismo en cuestión está en las bases de datos (N. Maldonado et al., 2018).

La diversidad metabólica de los hongos es mucho menor que la de las bacterias, por lo que identificarlos mediante pruebas bioquímicas es más difícil. La identificación fenotípica de los mismos se suele realizar a través del análisis macroscópico del micelio y microscópico de sus estructuras reproductivas (conidios, basidios, etc.) esto requiere de una gran experticia y está lejos del alcance de un estudiante en biotecnología adquirirla durante su trabajo de titulación.

Una alternativa, tanto para bacterias como hongos, para cuando las identificaciones fenotípicas no pueden implementarse, o la identificación por este método no es concluyente, es el análisis genotípico de los microorganismos. Estos se basan en la amplificación por PCR de ciertos genes (típicamente 16 S ADNr en bacterias) y su posterior secuenciación para la comparación de la secuencia con las bases de datos públicas mediante herramientas como el BLAST (*Basic Local alignment Search Tool*) (Asuar, n.d.). Aunque es una técnica que ofrece muy buenos resultados resulta laboriosa y costosa como método estándar de identificación de macroorganismos. Sin embargo, resulta útil para superar las limitaciones de la aplicación de métodos fenotípicos para la identificación de hongos en la FICA de la UISEK.

Con estos antecedentes, el presente trabajo se planteó el primer paso en la evaluación del riesgo microbiológico del Laboratorio de Investigación de la UISEK, es decir, la caracterización de las especies de microorganismos presentes en el mismo. Para ello se planteó una metodología sencilla en tres pasos: primero, en el muestreo con Placas Petri, abiertas en lugares estratégicos del Laboratorio de Investigación de la UISEK durante 24 h; segundo, la obtención de cultivos axénicos

# **EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

a partir del muestreo; y tercero, la identificación fenotípica de bacterias y la identificación genotípica de los hongos. Esto permitirá continuar con la evaluación del riesgo, diseñando escenarios específicos y, sobre todo, determinar si los riesgos son aceptables o no (por ejemplo, si se identificara un microorganismo infeccioso que pudiera comprometer la salud del personal UISEK o de los estudiantes) y por último diseñar e implementar medidas de prevención y mitigación de los riesgos.

## **1.1.HIPÓTESIS**

En el Laboratorio de Investigación de la FICA - UISEK circulan microorganismos (bacterias y hongos) que podrían afectar a los procesos que se realizan en el mismo como pueden ser las pruebas moleculares basadas en PCR (cualquiera que sea su objetivo o aplicación) o los cultivos celulares. Por otro lado, dada la naturaleza de los trabajos desarrollados hasta la fecha, no se estima que circulen patógenos que pudieran afectar a la salud del personal que trabaja en el Laboratorio de Investigación.

## **1.2.OBJETIVOS**

Caracterizar los microorganismos circulantes en el Laboratorio de Investigación de la FICA – UISEK.

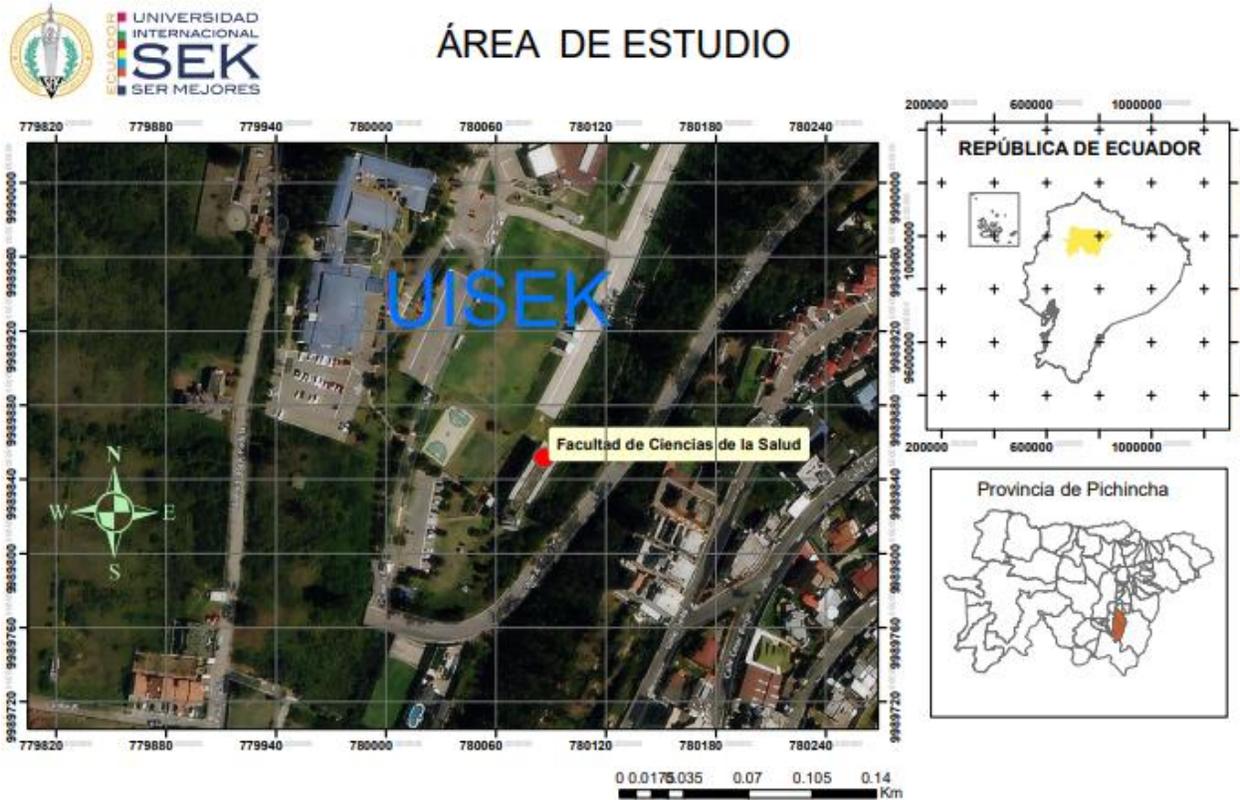
### **Específicos**

- Identificar las bacterias circulantes en el Laboratorio de Investigación de la FICA – UISEK
- Identificar los hongos circulantes en el laboratorio de Investigación de la FICA – UISEK

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

## 2. MATERIALES Y METODOS

### Área de estudio



### 2.1. Equipos y Reactivos

*Tabla 1. Equipos para bacterias*

Nombre	Modelo	Marca
Balanza analítica	BAS 31 plus	BOECO Germany
Plancha de calentamiento	HP88854105	Thermo SCIENTIFIC
Autoclave	WAC-80	DAIHAN Scientific
Incubadora	B12	Heraeus INSTRUMENTS
Refrigeradora 1	-	Durex
Microscopio	CH20BIMF110	OLYMPUS

**EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

*Tabla 2. Equipos para hongos*

<b>Nombre</b>	<b>Modelo</b>	<b>Marca</b>
Balanza analítica	BAS 31 plus	BOECO Germany
Plancha de calentamiento	HP88854105	Thermo SCIENTIFIC
Autoclave	WAC-80	DAIHAN Scientific
Incubadora	B12	Heraeus INSTRUMENTS
Refrigeradora 1	-	Durex
Refrigeradora 2	WRI51AKTWW	Whirlpool
Vortex	-	-
Centrifuga	CF-10	DAIHAN Scientific
Microondas	MS-72ML	LG
Incubadora de tubos epp.	HB-96D	DAIHAN Scientific
Cámara de luz UV	441203	uvitec
Cámara de electroforesis	-	Thermo SCIENTIFIC
Qubit	-	-
Transiluminador UV	-	-

*Tabla 3. Reactivos para bacterias*

<b>Nombre</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Casa comercial</b>
Peróxido de hidrogeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	BioGENA
Reactivo de KOVAC	-	MERCK
Fucsina Básica	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> CIN <sub>3</sub>	Panreac
Cristal violeta	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>3</sub> Cl	-
Reactivo de Lugol	-	HR Representaciones
Alcohol-Cetona	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O*C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	-
Aceite de inmersión	-	BioGENE

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

*Tabla 4. Reactivos para Hongos*

<b>Nombre</b>	<b>Casa comercial</b>
Fast DNA Spin Kit	Mpbio
Primer: ITS3 & ITS4	Invitrogen
SyberSafe	Invitrogen
TAE 50X	
Agarosa	Invitrogen
PureLink Quick PCR Purification kit	Invitrogen
10x Dream Taq Buffer	Thermo Scientific

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Aislamiento de los microorganismos**

#### **2.2.1.1. Muestreo de bacterias y hongos**

Se realizó un muestreo en 8 puntos diferentes dentro del Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas “FICA”, durante 24 h mediante placas Petri abiertas con medios de cultivo para bacterias y hongos. Los puntos estratégicos escogidos para el muestreo fueron: 1, parte superior de la estufa; 2, parte superior de la mesa de trabajo, encima de la balda; 3, parte superior del anaquel de madera de los reactivos; 4, parte superior de la campana de flujo laminar; 5, parte superior del anaquel del cuartito de biología molecular y serología; 6, en la parte superior de la nevera; 7, sobre la ventana situada encima del autoclave; y 8, encimera donde se encuentran las placas agitadoras y la balanza de precisión.

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

## 2.2.1.2. Preparación de los medios de cultivo

*Tabla 5. Medio de cultivo para bacterias*

No.	Medio de cultivo	Composición por litro
1	Agar Nutritivo	Extracto de res 3g; Peptona 5g; Agar 15g.
2	Medio SIM	Digerido pancreático de caseína 20g; Digerido péptico de tejido animal 6,1g; $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2g; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,2g; Agar 3,5g.
3	Agar Citrato de Simmons	Agar 15g; NaCl 5g; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 2g; $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1g; $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 1g; $\text{MgSO}_4$ 0,2g; $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$ 0,08g.

*Tabla 6. Medio de cultivo para hongos*

No.	Medio de cultivo	Composición por litro
1	Agar Glucosa Sabouraud	D (+)-Glucosa 40g; Mezcla de Peptonas 10g; Agar 15g.

En la **Tabla 5 y 6** se muestran todos los medios de cultivos que se utilizaron para el aislamiento de bacterias y hongos. Éstos se prepararon de la siguiente manera: primero, se realizaron los cálculos para un número determinado de puntos de muestreo y placas a emplear dentro del Laboratorio de Investigación de FICA; después se prepararon los medios de cultivo de acuerdo a las cantidades establecidas en las mencionadas tablas; una vez ya disueltos los medios, se procedió a autoclavar a 121°C por 20m y se enfriaron a temperatura ambiente; por último se distribuyeron en las placas a utilizar. No se realizó el ajuste del pH porque se pretendía recoger todos los microorganismos que se encuentran dentro del ambiente del Laboratorio.

# **EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

## **2.2.1.3. Obtención de cultivos puros de bacterias y hongos**

### **Bacterias**

Tras 24 h de muestreo, se procedió a incubar las placas a 30°C por 72 h para obtener el mayor número de microorganismos. Las placas mostraron una variedad de colonias que fueron diferenciadas por su forma y color para proceder a su aislamiento en placas Petri con sus respectivos medios de cultivo mediante estriado con asa de siembra. El repique de las colonias aisladas se repitió hasta obtener cultivos axénicos.

### **Hongos**

El repique de los hongos se llevó a cabo cuando el crecimiento del micelio fue visible en el medio sólido. Las diferentes colonias de hongos se tomaron con un asa de cultivo esterilizada y se las sembraron en cajas Petri con el medio Sabouraud. Todo el procedimiento se lo repitió hasta obtener cultivos axénicos.

## **2.2.2. Identificación de los microorganismos aislados**

### **2.2.2.1. Identificación morfológica de bacterias**

Para la tinción Gram (Akter et al., 2016), mediante el asa de siembra, se tomó una colonia del cultivo puro y se extendió en una gota de agua destilada estéril colocado sobre un portaobjetos estéril. Se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó utilizando el mechero. Luego se agregó una solución de cristal violeta al 0,5% durante 1 minuto y se lavó delicadamente sin verter el agua destilada directamente sobre la muestra. A continuación, se colocó solución de Lugol como mordiente durante 1 min. Luego, se añadió la solución de alcohol - acetona para decolorar durante

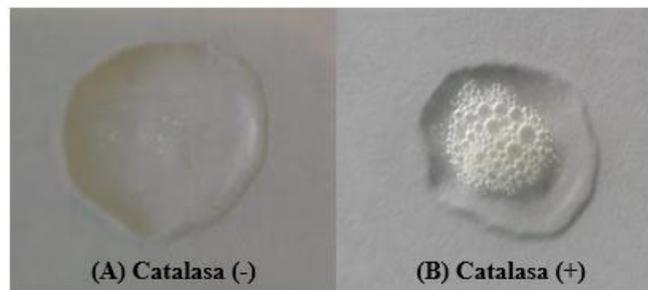
# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

5-30 segundos y se lavó con agua. Se añadió solución de fucsina básica al 2% se esperó durante 1 minuto y se lavó delicadamente con agua. Finalmente, el portaobjetos se examinó con un microscopio óptico con objetivo 100X utilizando aceite de inmersión.

## 2.2.2.2. Identificación bioquímica y fenotípica

### Prueba de Catalasa

Esta prueba sirve para identificar los microorganismos que expresan la enzima catalasa, presente en la mayoría de microorganismos que poseen citocromo. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas (**Figura 1**) (Reiner, 2016).



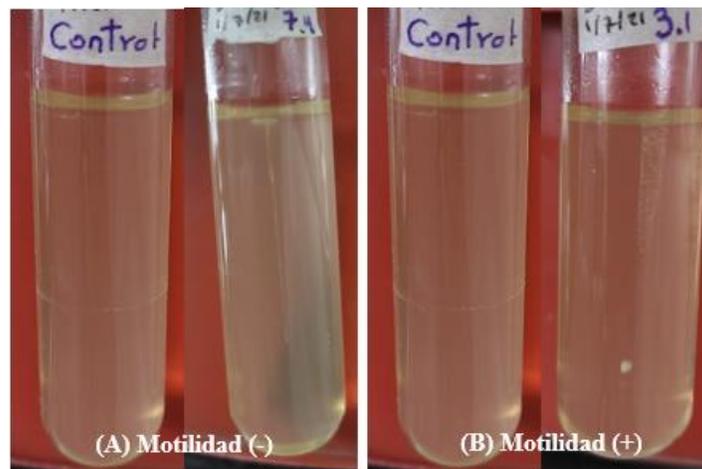
**Figura 1.** Prueba catalasa. (A) Catalasa (-): *Microbacterium oleivorans* y (B) Catalasa (+): *Microbacterium esteraromaticum*.

Mediante asa de siembra se dispersó una colonia del cultivo puro de 18 a 24 h de incubación sobre una gota de  $H_2O_2$  al 3% colocada en un portaobjetos con cuidado de no recoger agar que pudiera provocar falsos positivos. Se observó la formación inmediata de burbujas, lo que se consideró catalasa (+).

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

## Prueba de Motilidad

Esta prueba sirve para identificar si un microorganismo es móvil o inmóvil, principalmente en un medio de agar semisólido. Este medio tiene una consistencia muy suave que permite que las bacterias móviles migren fácilmente a través de ellos causando enturbiamiento (**Figura 2**). Las bacterias tienen movilidad por sus flagelos que se encuentra mayormente entre los bacilos aunque hay cocos flagelados (Silva-vega et al., 2020)



**Figura 2.** Prueba de motilidad. (A) Motilidad (-): *Microbacterium esteraromaticum* y (B) Motilidad (+): *Lysinibacillus fusiformis*

Mediante un punzón se tomó una colonia de cultivo puro de 18 a 24 h de incubación y se realizó una picadura sobre el medio SIM de 1,5 cm aproximadamente. Los tubos se incubaron entre 35 y 37°C y se examinaron a las 24 h. La movilidad bacteriana se determinó cualitativamente: la motilidad (+) se percibió como turbidez difusa o total en el medio, y la motilidad (-) como ausencia de crecimiento o crecimiento limitado únicamente al lugar de la picadura.

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

## Prueba de Indol

Esta prueba sirve para identificar microorganismos que degradan el aminoácido triptófano en indol. La presencia de la enzima triptofanasa en las bacterias provoca la hidrólisis del aminoácido y su desaminación, produciendo indol. La **figura 3** muestra la reacción de desaminación catalizada por triptofanasa, durante la cual se elimina el grupo amino ( $-NH_2$ ) de la molécula de triptófano. Los productos finales de la reacción son indol, ácido pirúvico, amonio ( $NH_4^+$ ) y energía. Se requiere fosfato de piridoxal como coenzima.



**Figura 3.** Prueba indol. (A) Indol (-): *Kocuria marina*

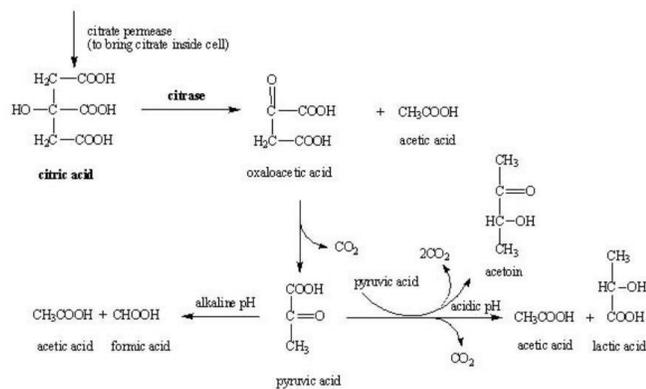
Cuando el indol reacciona con el reactivo de Kovac (que contiene ácido clorhídrico y p-dimetilaminobenzaldehído en alcohol amílico), la solución cambia de amarillo a rojo cereza. Debido a que el alcohol amílico no es soluble en agua, la coloración roja se formará en una capa aceitosa en la parte superior del caldo (**Figura 3**) (MacWilliams, 2009).

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Luego de interpretar el resultado de la motilidad, se agregaron 2 o 3 gotas de reactivo Kovacs en los tubos y se observó el cambio de color a rojo en el caso de bacterias indol (+). Las colonias que no provocaron cambio de color en el reactivo de Kovacs se consideraron indol (-).

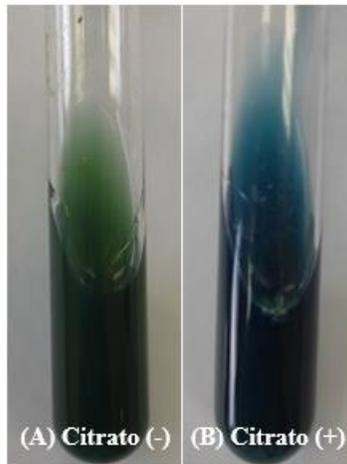
## Prueba de Citrato

El agar citrato se utiliza para probar la capacidad de un organismo para utilizar el citrato como fuente de energía. El medio contiene citrato como única fuente de carbono y sales inorgánicas de amonio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden crecer en este medio producen una enzima, citrato-permeasa, capaz de convertir el citrato en piruvato (**Figura 4**). Cuando las bacterias metabolizan el citrato, las sales de amonio se descomponen en amoníaco, lo que aumenta la alcalinidad. El cambio de pH convierte el indicador de bromotimol verde en azul intenso por encima de un pH de 7,6 (**Figura 5**) (V. Benvenuto, 2017).



**Figura 4.** Degradación el citrato en piruvato

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD



**Figura 5.** (A) Citrato (-): *Bacillus weihenstephanensis* y (B) Citrato (+): *Staphylococcus xylosus*

4 mL de medio agar citrato de Simmons estéril se vertieron en tubos de 10 mL estériles inclinados y se dejaron solidificar. Una colonia de del cultivo puro de 18 a 24 h de incubación, se sembró en la superficie inclinada del medio de cultivo y los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 h. A continuación, se observó el cambio de color: las muestras citrato (+) provocaron un cambio de color a azul intenso, mientras que las muestras citrato (-) mantuvieron el color verde del medio citrato de Simmons.

## 2.2.2.3. Identificación proteómica por espectrofotometría de masas MALDI-TOF

### Extracción

Para la identificación por espectrometría de masas MALDI – TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*) por sus siglas en Ingles, se empleó el siguiente método de preparación de las muestras a partir de las colonias cultivadas 24 h en agar nutritivo: una de las colonias crecidas en agar nutritivo se colocó sobre la placa metálica del espectrómetro de masas empleando un palillo de madera estéril y se dejó secar al aire tras añadirle 1µl de ácido fórmico al

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

100%. Tras este paso, se añadió 1µl de solución saturada de la matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico y se dejó secar al aire. Esta solución se preparó disolviendo 2,5 mg de matriz en una mezcla de 23 acetonitrilo, ácido fórmico, H<sub>2</sub>O ultra pura en proporción 475:25:500 v/v/v. Tras este paso se procedió a la lectura.

## Lectura e interpretación de resultados en MALDI - TOF

Una vez secas las colonias con la matriz, en la placa metálica del MALDI - TOF, se procedió a la identificación proteómica de las bacterias. Siguiendo el INST-TEC-N°030 del laboratorio Centro de Investigación Microbiológica (CIM), se esperó a que se alcanzara el vacío en el equipo, y se procedió a la lectura de los pocillos de la placa metálica. Cada pocillo recibió 240 disparos de láser, los cuales permitieron elevar las proteínas y acelerarlas en sistema TOF: según el tiempo de vuelo de cada proteína se determinó su masa molecular y el espectro obtenido se comparó con la base de datos (Software flexcontrol 3.1). Se consideraron como identificaciones óptimas todas aquellas con un score mayor de 1.999.

### 2.2.2.4. Identificación fúngica por secuenciación Sanger

*Tabla 7. Cebadores utilizados para la amplificación de hongos*

Primer	Secuencia	Dirección	Tamaño del amplicón	Temperatura de hibridación	Referencia
ITS <sub>3</sub>	GCATCGATGAAGAACGCAGC	Forward	330pb	43-55°C	White et al., 1990
ITS <sub>4</sub>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Reverse			

## EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

El proceso de extracción de ADN se partió de cultivo de hongos puro en medio Sabouraud conservado a 5°C, con la finalidad de mantener sus estructuras y evitar que se contaminen hasta continuar con el proceso, para ello se realizó el protocolo FastDNA Spin Kit.

Utilizando palillos esterilizados, se tomaron aproximadamente 1cm<sup>2</sup> de cultivo puro de hongo que presentaba micelio evitando tomar la menor cantidad posible de medio agar, se colocaron en tubos de Lysing Matrix con agua destilada y se realizó el protocolo para su extracción de ADN, después se almacenaron a -20°C.

La amplificación de la región hipervariable del ADN<sub>r</sub> de 5.8S se la realizó con un volumen final de 25uL, añadiendo Dream taq para su reacción y con una concentración de 1µM para los cebadores. Posteriormente se programó el equipo de Termociclador de la siguiente manera: 35 ciclos, para la desnaturalización inicial a 95°C por 3min, seguidamente de una desnaturalización a 94°C por 1min, con hibridación a 55°C por 1min, la extensión a 72°C por 1.5 min y la extensión final a 72°C por 3 min. A demás, se realizó una reacción sin ADN como control negativo, mientras que todas las reacciones fueron añadidas el ADN de las diferentes muestras de hongos aislados utilizando los respectivos cebadores como se muestran en la **tabla 7**.

A todos los productos de amplificación se los realizó una electroforesis utilizando gel agarosa al 1,5% teñido de Syber Safe (1 µl/ml) por 1h a 100 v. Con el uso de una micropipeta se realizó la mezcla de 6 µL de producto de PCR, más 3 µL de buffer de carga y en los pocillos laterales 4 µL de marcador para determinar el tamaño de los amplicones, una vez culminada la electroforesis se visualizó mediante una cámara de luz UV. Para su purificación de los productos de PCR, se utilizó el Kit de Invitrogen PureLink Quick Gel Extraction con su respectivo protocolo.

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Posteriormente se midió la concentración de ADN con el Kit de Thermo-Fisher (Qubit™ dsDNA BR Assay Kit) según sus instrucciones del protocolo, esto con la finalidad de calcular si su concentración de ADN era la requerida para su proceso de secuenciación.

Los productos de PCR positivos fueron enviados a Corea a la empresa MacroGen para su secuenciación, el cual utilizaron el método de secuenciación por Didesoxi Sanger. Al tener los resultados de secuenciación se utilizó el BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) y para comparar estos resultados se utilizó como un segundo programa el MEGA X, el cual nos permite la identificación de los organismos mediante un árbol filogenético con sus respectivos marcadores ITS (*internal transcribed spacer*).

## 3. RESULTADOS

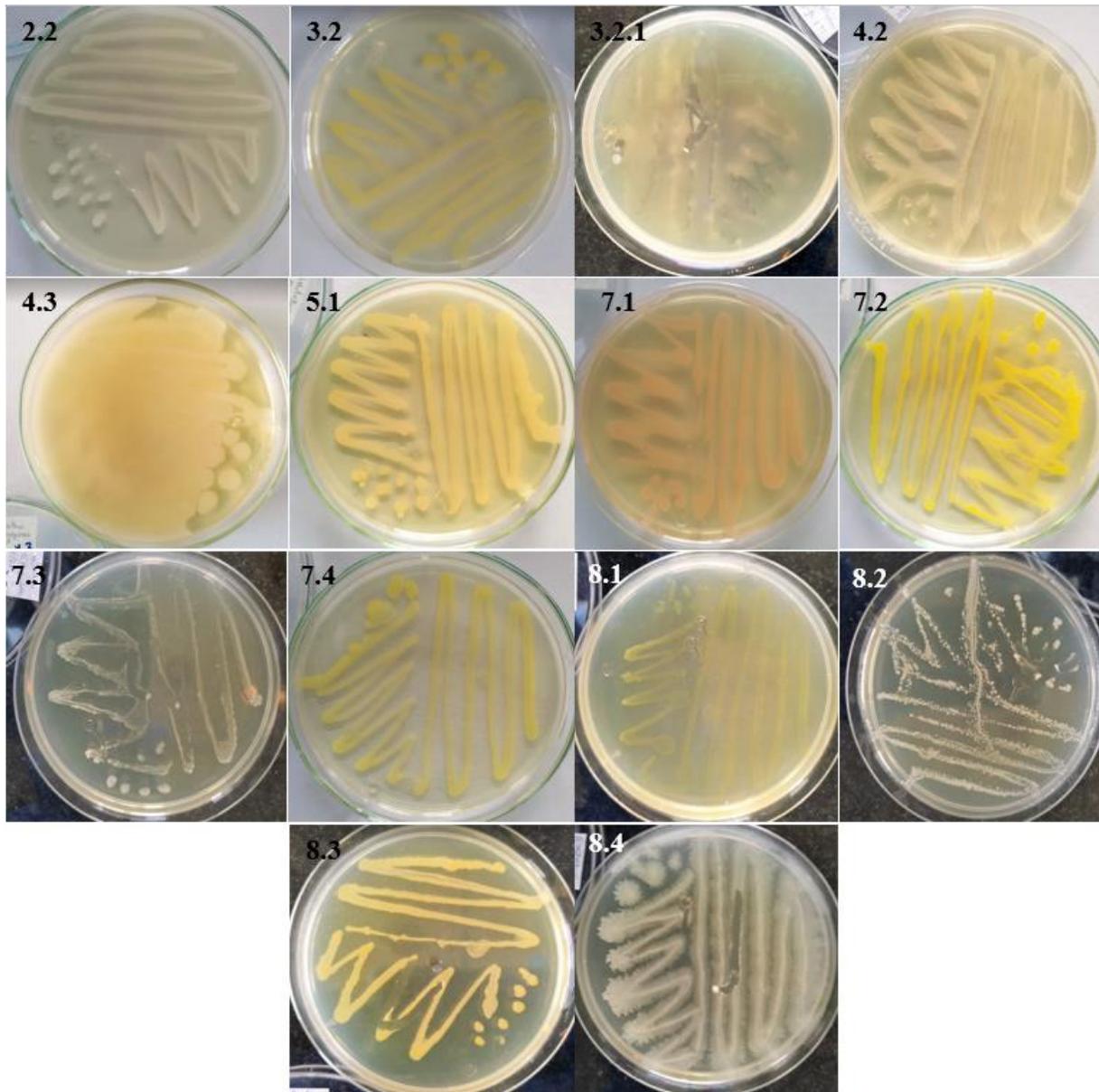
### 3.1. Aislamiento de cultivos puros de bacterias y hongos

#### **Bacterias**

A partir de las placas empleadas para el muestreo en el Laboratorio de Investigación de a UISEK se obtuvieron 14 cultivos axénicos, tal y como se muestra en la **tabla 8**.

En la **figura 6**, se observan los 14 cultivos axénicos obtenidos. Estas bacterias aisladas crecieron a una temperatura entre 30 y 37°C, un rango de temperatura propio de microorganismos mesófilos, en un tiempo de 24 - 48h en medio nutritivo.

## EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD



**Figura 6.** Cultivos axénicos, vista superior en cajas Petri. Todos los cultivos son a partir de muestras ambientales dentro del laboratorio de Investigación de la UISEK cultivados en medio de Agar Nutritivo.

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

## 3.1.1. Caracterización microscópica de bacterias aisladas

Con el uso del microscopio óptico y tinción Gram se realizó la identificación morfológica de las bacterias como se muestran en la **tabla 8**. Tal y como se puede observar, la mayoría de las formas celulares correspondieron a cocos Gram +.

*Tabla 8. Caracterización microscópica*

Cepa	Morfología	Tinción de Gram
2.2	Cocos	+
3.2	Bacilos en forma de bastón	-
3.2.1	Bacilos en forma de bastón	+
4.2	Cocos	+
4.3	Bacilos en forma de bastón	+
5.1	Cocos	+
7.1	Bacilos en forma de bastón	+
7.2	Cocos	+
7.3	Cocos	+
7.4	Bacilos en forma de bastón	+
8.1	Bacilos en forma de bastón	+
8.2	Cocos	+
8.3	Bacilos en forma de bastón	+
8.4	Cocos	+

## 3.1.2. Caracterización bioquímica de bacterias aisladas

Se realizaron 3 pruebas bioquímicas y una fenotípica para la identificación de las bacterias aisladas dentro del laboratorio. Como se muestra en la **tabla 9**, 11/12 fueron catalasa (+); ninguna de las bacterias fue indol (+); 2/12 fueron bacterias móviles; y 2/12 fueron citrato (+).

## EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**Tabla 9:** Caracterización bioquímica

Cepa	Catalasa	Motilidad	Indol	Citrato
2.2	+	-	-	-
3.2	+	-	-	-
3.2.1	+	+	-	+
4.2	+	-	-	-
4.3	+	-	-	-
5.1	+	-	-	-
7.1	-	-	-	-
7.2	+	-	-	-
7.3	+	-	-	-
7.4	+	-	-	-
8.1	+	+	-	-
8.2	+	-	-	-
8.3	+	-	-	-
8.4	+	-	-	+

### 3.1.3. Identificación por MALDI-TOF de bacterias aisladas

Por último, se realizó otra prueba fenotípica que se basa en la comparación de perfiles proteómicos mediante MALDI – TOF. Esta técnica, barata y muy rápida en comparación con las tiras API, los sistemas automatizados VITEK<sup>®</sup> o la identificación molecular por secuenciación de 16S ADN<sub>r</sub>, permite la identificación a nivel de género y especie, e incluso a nivel de subespecie. Su limitación reside en el hecho de que, aunque las bacterias de interés clínico están bien representadas en las bases de datos de la plataforma del MALDI – TOF, no siempre se encuentran todas las bacterias ambientales. Para una identificación positiva a nivel de género y especie se requieren *scores* superiores o iguales a 1.999.

## EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

En la **tabla 10**, podemos observar los resultados obtenidos mediante MALDI – TOF. Como puede observarse, todos los scores superan el 2.0, por lo que las identificaciones se consideran positivas y de calidad.

**Tabla 10.** Cepas bacterianas identificadas en el proceso de muestreo

N°	Cepa	Fuente de inóculo	Identificación por MALDI-TOF	Score
1	2.2		<i>Staphylococcus cohnii</i>	2.082
2	3.2		<i>Sphingomonas desiccabilis</i>	2.214
3	3.2.1		<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2.120
4	4.2		<i>Staphylococcus equorum</i>	2.196
5	4.3		<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	2.010
6	5.1	Muestreo ambiental	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	2.475
7	7.1	dentro del laboratorio de	<i>Deinococcus ficus</i>	2.079
8	7.2	Investigación de la	<i>Kocuria marina</i>	2.161
9	7.3	UISEK	<i>Staphylococcus warnerii</i>	2.182
10	7.4		<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	2.331
11	8.1		<i>Curtobacterium albidum</i>	2.062
12	8.2		<i>Staphylococcus hominis</i>	2.394
13	8.3		<i>Microbacterium oleivorans</i>	2.001
14	8.4		<i>Staphylococcus xylosus</i>	2.003

Finalmente, **la tabla 11** nos muestra el resumen de todos los datos relativos a la identificación de nuestros cultivos axénicos y se indica la concordancia de los resultados bioquímicos con la bibliografía para las especies identificadas mediante MALDI - TOF. Como se puede observar, la concordancia entre las pruebas morfológicas, bioquímicas y proteómicas es total para todas las bacterias aisladas menos para *Microbacterium esteraromaticum*. Esto nos indica que las identificaciones por MALDI – TOF son útiles para los objetivos del presente trabajo.

**EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

*Tabla 11. Cepas bacterianas identificadas en el proceso de muestreo*

<b>Cepa</b>	<b>Fuente de inóculo</b>	<b>Morfología</b>	<b>Gram</b>	<b>Catalasa</b>	<b>Motilidad</b>	<b>Indol</b>	<b>Citrato</b>	<b>Identificación por MALDI-TOF</b>	<b>Concordancia de resultados con bibliografía</b>
2.2		Cocos	+	+	-	-	-	<i>Staphylococcus cohnii</i>	Total
3.2		Cocos	-	+	-	-	-	<i>Sphingomonas desiccabilis</i>	Total
3.2.1		Bacilos en forma de bastón	+	+	+	-	+	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	Total
4.2		Cocos	+	+	-	-	-	<i>Staphylococcus equorum</i>	Total
4.3		Bacilos en forma de bastón	+	+	-	-	-	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	Total
5.1	Muestreo	Cocos	+	+	-	-	-	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	Total
7.1	ambiental dentro	Bacteria en forma de varilla	+	-	-	-	-	<i>Deinococcus ficus</i>	Total
7.2	del laboratorio de	Cocos	+	+	-	-	-	<i>Kocuria marina</i>	Total
7.3	Investigación de	Cocos	+	+	-	-	-	<i>Staphylococcus warnerii</i>	Total
7.4	la UISEK	Bacilos en forma de bastón	+	+	+ <sub>a</sub>	-	-	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	Parcial
8.1		Cocos	+	+	+	-	-	<i>Curtobacterium albidum</i>	Total
8.2		Cocos	+	+	-	-	-	<i>Staphylococcus hominis</i>	Total
8.3		Bacteria en forma de bacilo	+	+	-	-	-	<i>Microbacterium oleivorans</i>	Total
8.4		Cocos	+	+	-	-	+	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Total

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

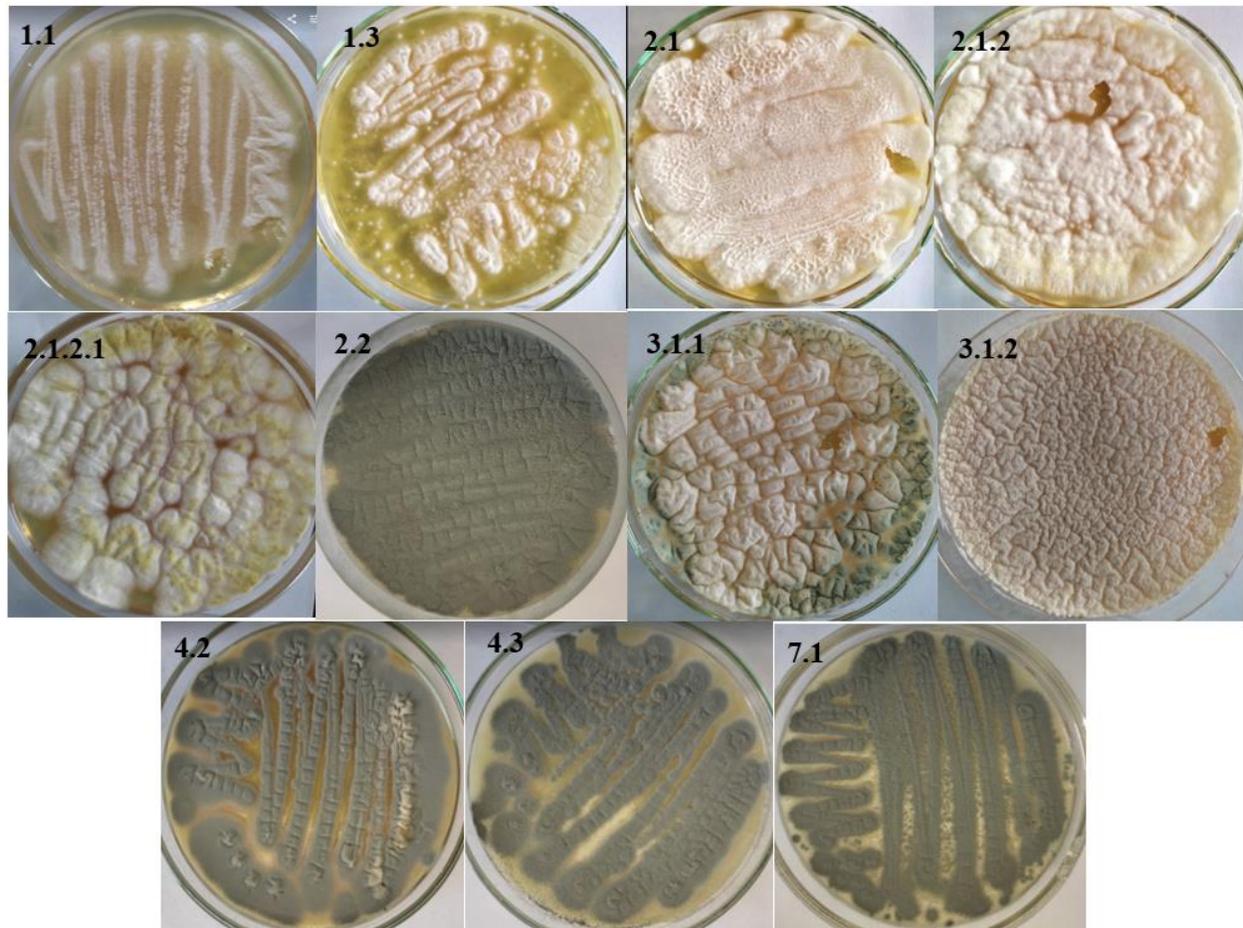
## IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA

### 3.2. Identificación macroscópica de los hongos aislados

A partir de las placas empleadas para el muestreo en el Laboratorio de Investigación de a UISEK se obtuvieron 11 cultivos axénicos en agar Sabouraud, tal y como se muestra en la **figura 7**.

Basándonos en el aspecto macroscópico de los micelios, se pudieron identificar al menos 4 especies: la primera, correspondiente a las placas (2.2), (3.1.1), (4.2), (4.3), (7.1), presenta una textura de las colonias aterciopelada, afelpada, vellosa o algo plegada, con margen blanquecino o beige. El color inicialmente es blanco virando en aproximadamente siete días a un verde azulado por la producción de conidias y el reverso de la colonia es incoloro; la segunda, correspondiente a las placas (1.1), (1.3) presenta una textura de color blanco, algodonado con vellosidades que mantiene su color hasta su vejez; la tercera, correspondiente a las placas (2.1), (2.1.2), (2.1.2.1) presenta una textura de color blanco, con una superficie algodonada, siendo sus micelios de color amarillo, y cambia a color verde al llevar a la etapa adulta; y la cuarta, correspondiente a las placas (3.1.2) presenta una textura de color blanco con porosidades, no presenta superficie ni vellosidades, empieza de color blanco y se extiende por toda la placa para aprovechar el medio para su crecimiento. Hay que tener en cuenta que en la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas no contamos con personal experto en micología, por lo que estos resultados deben ser puestos en cuarentena hasta confirmarlos por medio de las pruebas moleculares basadas en PCR y secuenciación.

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD



**Figura 7.** Cultivos axénicos. Vista macroscópica del aislamiento de hongos en el laboratorio de Investigación de la SEK

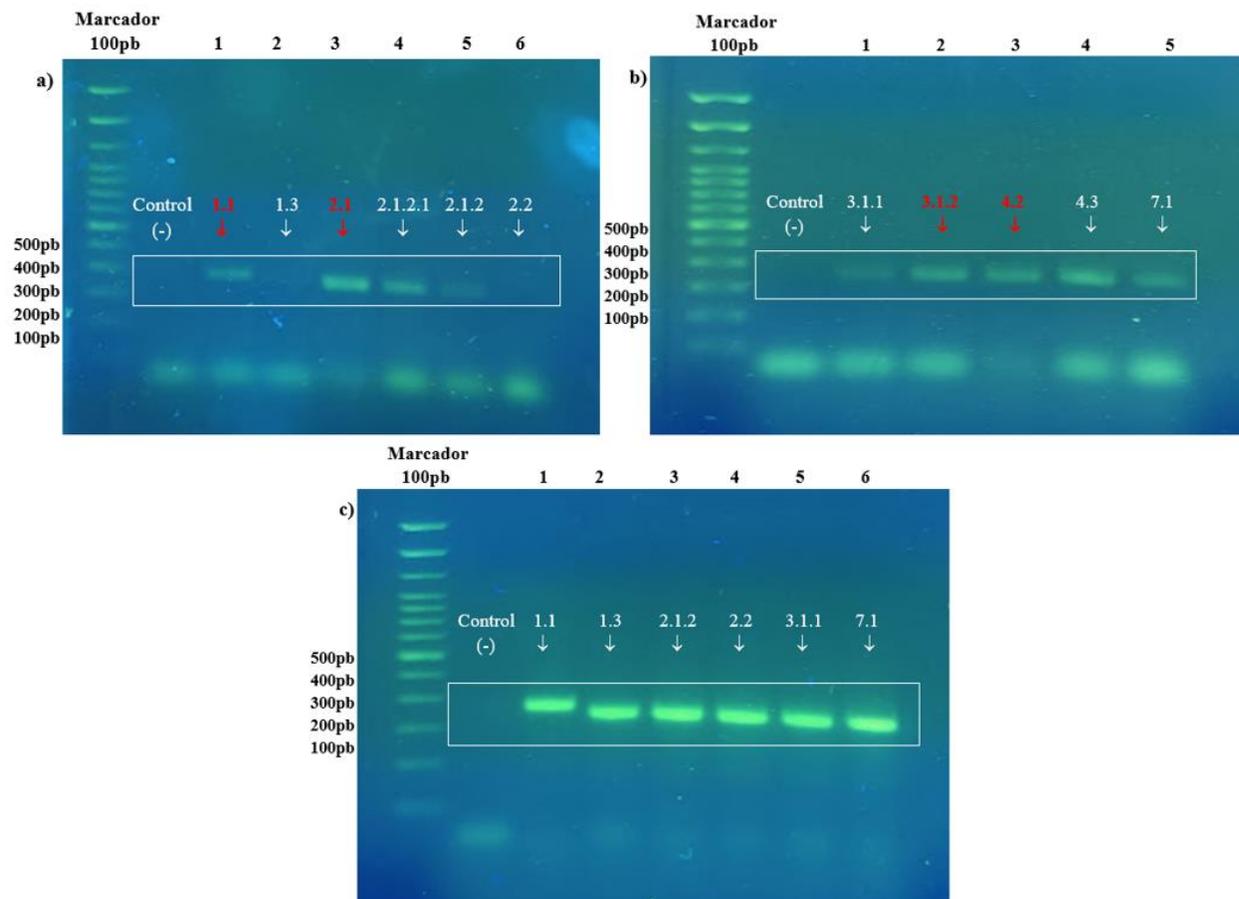
## 3.2.1. Identificación fúngica por secuenciación Sanger

Para la identificación de los hongos aislados (**Fig. 7**) se procedió a amplificar las regiones hipervariables de ITS del ADNr mediante los *primers* ITS3 y 4 (**Tabla 7** de materiales y métodos) para su posterior secuenciación por el método Sanger.

En la **figura 8** se muestran electroforesis en agarosa representativas de los productos de PCR (300 – 400 pb) de los hongos aislados. Tal y como puede observarse, se logró una amplificación positiva para todos ellos. Tras enviar los productos a secuenciar, se obtuvieron

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

cuatro secuencias distintas, confirmando que se trataba efectivamente de cuatro especies de hongos. Las diferencias morfológicas entre placas con la misma especie pueden deberse, por tanto, a distintas fases o momentos del crecimiento fúngico.



**Figura 7.** Electroforesis de los productos de amplificación por PCR. (a) 1.1: *Trametes hirsuta*, 2.1: *Fusarium solani*, (b) 3.1.2: *Aspergillus flavus*, 4.2: *Aspergillus fumigatus*, (c) amplificación más definida de los productos de PCR con menor cantidad de ADN de a y b.

## EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

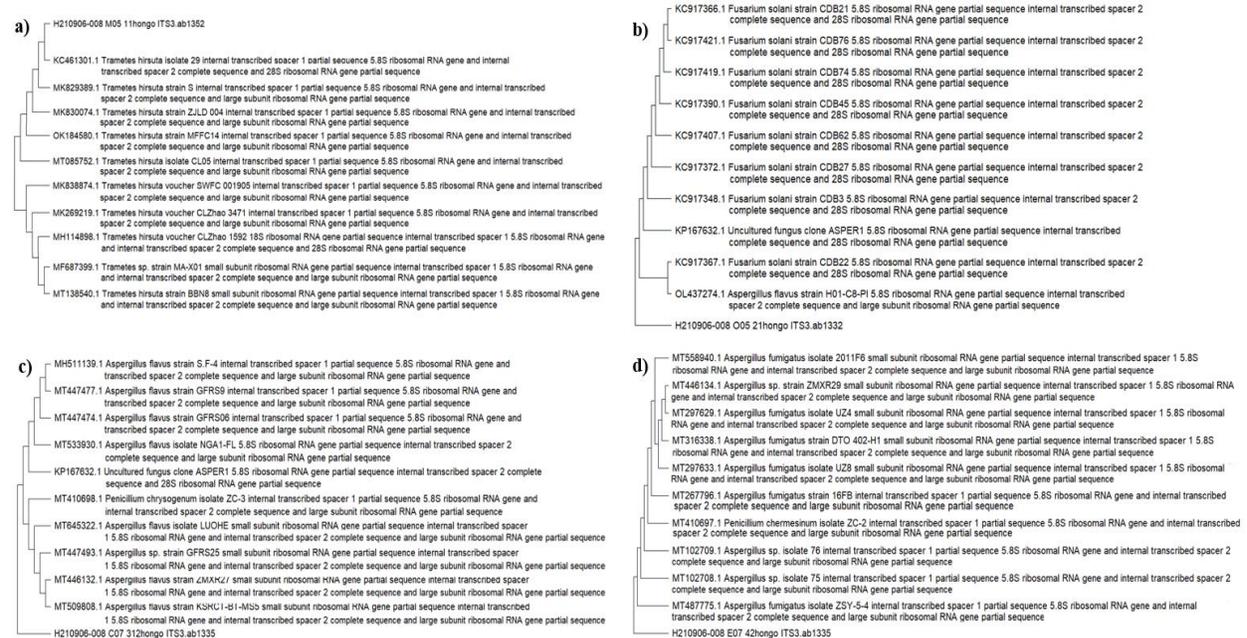
Para la identificación de los hongos a partir de las secuencias obtenidas se empleó la herramienta BLAST. En la **tabla 12** se muestra la identificación de los hongos y el porcentaje de identidad arrojado por la herramienta BLAST.

*Tabla 12. Identificación de los hongos mediante las secuencias de productos PCR en el BLAST*

Hongo	Especie	% de identidad
1	<i>Trametes hirsuta</i>	97.12%
2	<i>Fusarium solani</i>	99.68%
3	<i>Aspergillus flavus</i>	99.36%
4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99.68%

Los porcentajes de identidad superiores a 99% se consideraron identificaciones positivas sin más, pero para *Trametes hirsuta* este porcentaje fue de 97.12%, por lo que además del BLAST de las secuencias, se procedió a realizar el árbol filogenético con el programa MEGA X mediante el método de sustitución nucleotídica *Maximum likelihood*. Los resultados se muestran en la **figura 9**. Tal y como puede observarse en el árbol a), la muestra problema está estrechamente relacionada con otras secuencias de *Trametes hirsuta*, por lo que esta identificación también se considera positiva.

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD



**Figura 9.** Árbol Filogenético (Maximum likelihood) basado en secuencias ITS. a, *Trametes hirsuta*; b, *Fusarium solani*; c, *Aspergillus flavus*; y d, *Aspergillus fumigatus*.

## 4. DISCUSIÓN

En este trabajo, mediante el muestreo con Placas Petri abiertas durante 24 h en los lugares indicados en materiales y métodos, se identificaron un total de 14 bacterias distintas y 4 especies de hongos.

*Staphylococcus cohnii* forma parte de la flora de la piel humana y de ciertas mucosas (Álvarez Posadilla et al., 2006). Su peligrosidad no es alta y solo se han registrado algunos casos de infección. Sin embargo, en estudiantes o docentes que estén inmunodeprimidos puede generar fiebre y vómito. La particularidad de este microorganismo es que se adhiere fácilmente a superficies como vidrio y plásticos, mismos que están presentes en el laboratorio. Su eliminación no es compleja y varios estudios realizados han demostrado que una solución de NaClO

## EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

(hipoclorito de sodio) puede reducir en un 100% el crecimiento de este organismo (Dolores et al., 2013).

*Sphingomonas desiccabilis*: su origen es difícil de descifrar puesto que por lo general esta especie se encuentra en entornos muy específicos, por lo general poco acogedores. Se han hecho estudios incluso sobre su existencia en planetas extraterrestres. En la tierra se aisló en la Meseta de Colorado (Reddy, 2007). Su aparición en Laboratorio de Investigación puede haberse originado por algún estudio realizado con anterioridad en el que no se siguió con el protocolo correcto de desinfección.

*Lysinibacillus fusiformis* es una bacteria Gram positiva que por lo general se encuentra en el suelo. La temperatura en la cual se desarrolla es entre los 17° y 37° C por lo que no es una sorpresa haberla encontrado en el laboratorio ya que tienes las condiciones para desarrollarse. En el año 2020 fueron recogidas y aisladas por Joselyn S. quien realizó su investigación en un lugar muy remoto del Ecuador llamado cueva de los Tallos. Su investigación sirvió para caracterizar el microorganismo que produce enzimas quitinolíticas, lo cual puede ser un remedio en la lucha contra patógenos como hongos según (LIU, 2020).

*Staphylococcus equorum*: es muy común encontrarlo en lugares como la piel, mucosas, glándulas cutáneas de los mamíferos. La importancia de su control radica en su virulencia que, aunque es baja, se ha demostrado que ha infectado a humanos y animales. Además tiene una gran resistencia a los antibióticos (Nováková et al., 2006).

## EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

*Bacillus weihenstephanensis* pertenece al género *Bacillus* conocido por resistir varios procesos de esterilización como la pasteurización. El problema con estos microorganismos en específico reside en su capacidad de generar toxinas (Correa, 2016).

*Micrococos caseolyticus* es una de las bacterias que por sus características no se considera patógena y su peligrosidad es baja o nula, ya que hasta el día de hoy no se han registrado infecciones en humanos o mamíferos. Sin embargo, en China se ha demostrado que produce altas tasas de mortalidad en pollos de engorde en los que provoca hemorragia seguido de la exudación en cavidades del cerebro. También provocó la necrosis de los órganos internos (Oren, 2018).

*Deinococcus fuscus* es una bacteria grampositiva, no móvil que no esporula. Forma colonias de color rosa pálido en forma circular y con bordes completos y crece correctamente a los 37° C en un rango amplio de pH (5.5 – 10) (Lai et al., 2006).

*Kocuria marina*: su origen está en la piel, es decir, forma parte del microbiota natural además de otros entornos como suelo, agua y carne animal. La bacteria tiene una peligrosidad baja ya que los casos de infección en humanos son escasos (Microbiol et al., 2012).

*Staphylococcus warnerii*: esta especie suele ser una de las habituales en la familia de los estafilococos y por lo general se encuentra en la piel humana, saliva y mucosas. Su infección puede suponer graves problemas de salud: varios casos clínicos han presentado complicaciones como meningitis, endocarditis e infecciones de las vías urinarias. Dentro de los laboratorios este patógeno puede incluso infectar prótesis y, aunque no es muy común, se han encontrado en implantes y catéteres. Se estima que el 50% de los individuos son portadores (Ja et al., 2018).

## EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

*Microbacterium esteraromaticum* se puede aislar de procesos relacionados con la biorremediación de hidrocarburos. Las principales características son la capacidad para soportar alteraciones de la salinidad y rangos de temperatura extremos por lo que se considera que es un microorganismo con una gran adaptación ambiental. Este rasgo único se debe a la membrana que posee, y por lo general se halla en los suelos de la Patagonia donde utiliza los compuestos aromáticos como fuente de carbono para producir energía. Su eliminación requiere de desinfección intensa y especializada (Bosco, 2006). Es posible que su presencia en laboratorio se deba a estudios relacionados con la eliminación biológica de hidrocarburos realizada con anterioridad en la UISEK.

*Curtobacterium albidum* es conocida por ser un agente usado en la industria de la agricultura, ya que es un biocontrolador contra microorganismos como *Xanthomonas Campestris* (Juan & Reparaz, n.d.). Este microorganismo móvil es una de las especies más difíciles de encontrar pues la familia es demasiado heterogénea. Se logra aislar de cultivos de arroz y plantas y, a diferencia de otras especies analizadas anteriormente, estas bacterias no se presentan en el organismo humano. Sin embargo, puede provocar enfermedades (Funke et al., 2005).

*Staphylococcus hominis*, se encuentra en el cuerpo humano y puede ser causante de bacteriemia. No se han descrito enfermedades graves y tiene tratamiento, no obstante, se ha visto cómo van adquiriendo resistencia a los antibióticos por su gran habilidad de adaptación (M1 & Aparicio Egea C2, 2007). Daniel Bawdon y Gavin Thomas demostraron como este microorganismo es el causante del mal olor que se genera en las axilas al liberar tioalcoholes cuando se nutren del sudor (Thomas, 2015).

## EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

*Microbacterium oleivorans* es una bacteria Gram-positiva cuya característica más relevante es la capacidad para degradar el petróleo. Usan el crudo como fuente de carbono para generar energía y, por lo general, es identificada fenotípicamente por sus rasgos morfológicos y fisiología (Schippers et al., 2005). En este caso también, su presencia puede deberse a estudios de biorremediación realizados por tesistas de Ing. Ambiental.

*Staphylococcus xylosus* es conocida como una bacteria de tipo emergente y ha sido causante de infecciones en humanos, si bien es cierto que no se conocen muchos casos clínicos. Sin embargo, los pocos casos que se han registrado han sido graves en las que los pacientes han tenido que ser derivados a terapia intensiva por la fuerte inflamación sistémica. Se notó que los pacientes estaban inmunodeprimidos y mal nutridos por lo que se deduce que en pacientes con VIH este podría llegar a ser mortal. También se demostró que infecta a pacientes mayores puesto que todos tenían de 56 años en adelante (Esper et al., 2000).

*Trametes hirsuta*, es un hongo saprófito que se alimenta de madera en descomposición. Se ha encontrado que puede ayudar a la biorremediación y en el sector de la construcción puesto que reduce la toxicidad en un 80% de los colorantes llamados antraquinónicos (Carolina, 2016).

*Fusarium solani* puede provocar infección debido a que sus esporas pueden transportarse en el aire que respiramos y, una vez inhalado, causa infecciones a cualquier persona aunque las inmunodeprimidas están más expuestas. Su riesgo de contagio crece puesto que la distribución de esta especie es mundial. Se debe tener cuidado con heridas abiertas o mal curadas ya que se sabe que además de por inhalación entran al organismo por heridas provocando infecciones cutáneas (Monz et al., 1973).

## EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

*Aspergillus flavus* es un hongo filamentoso de distribución mundial. Es un microorganismo oportunista por lo que, al igual que el anterior hongo, este también se aprovecha de humanos que están con las defensas bajas. Atacan principalmente a los pulmones y vías respiratorias, se acopla fácilmente a la temperatura corporal humana (37°C ) y, una vez que ha infectado, empieza la secreción de toxinas como fumigatoxina y elastasa perjudiciales para los mamíferos (Alcalá et al., n.d.).

*Aspergillus fumigatus* es uno de los hongos encontrados que son extremófilos, pues soportan temperaturas que van desde los 12°C hasta 57°C. Su distribución es principalmente en el suelo y en vegetales que están en descomposición. La infección por esta especie puede alcanzar a los humanos y algunos animales de granja, aunque también se han visto casos en cetáceos. Principalmente entran al organismo por las vías respiratorias y mucosas y gracias a la producción de gliotoxina provoca temblores del cuerpo (Trabajo, 2012).

Entre los microorganismos encontrados tenemos algunos de origen humano, formando parte de la flora, y otros que tienen su origen en trabajos realizados en la UISEK. Aunque no encontramos ningún patógeno propiamente dicho, sí encontramos oportunistas que pueden ocasionar problemas de salud en individuos inmunosuprimidos. Por este motivo, se recomienda la implementación de protocolos de desinfección periódicos para reducir la probabilidad de infecciones en el personal que trabaja en la UISEK. Recientemente se ha acondicionado el laboratorio con sistemas independientes de ventilación que esperamos contribuyan a disminuir la presencia de estos y otros microorganismos.

# **EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

## **5. CONCLUSIONES**

- La mayoría de los microorganismos encontrados son de origen ambiental o forman parte de la flora humana. La presencia de alguno de ellos solo se explica por investigaciones realizadas en el pasado.
- En general el riesgo microbiológico no se considera alto. No se encontraron patógenos, pero sí microorganismos oportunistas que pueden provocar problemas de salud en determinados individuos con características especiales.

## **6. RECOMENDACIONES**

- Prescindir de las pruebas fenotípicas bioquímicas manuales para la identificación bacteriana que consumen tiempo y dinero. En cambio, recurrir de manera más rutinaria al MALDI – TOF.
- Después de haber realizado la investigación, se deben implementar protocolos de limpieza y desinfección acordes a los microorganismos empleados. Se recomienda tener en cuenta los protocolos de bioseguridad y sanidad dentro de los laboratorios, además de realizar inspecciones periódicas para comprobar que la inocuidad se mantiene y al menos bajar la probabilidad de riesgo microbiológico.
- Capacitar a los estudiantes sobre los procedimientos y medidas de bioseguridad, además de en los procedimientos de descontaminación, en concreto de los microorganismos que están empleando en cada una de las investigaciones. No todos pueden ser tratados de la misma manera.

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Agua, M., Normalmente, P., En, P., & Observar, R. (n.d.). *Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias*.

Alcalá, L., Muñoz, P., & Peláez, T. (n.d.). *Aspergillus y aspergilosis*.

Álvarez Posadilla, M., Linares Torres, P., Bailador Andrés, C., Suárez Álvarez, P., & Olcoz Goñi, J. L. (2006). Bacteriemia por *Staphylococcus cohnii* asociado a colecistitis aguda.

*Anales de Medicina Interna*, 23(1), 51–52. <https://doi.org/10.4321/s0212-71992006000100016>

Antonio, J., & Nieto, S. (n.d.). *bacteriana en el laboratorio de microbiología*.

Akter, M., Rahman, M., & Fakhruzzaman, M. (2016). Isolation and identification of bacteria with determination of bacterial loads from different brands of butter and cheese. *Asian Australas.*

Aplicaci, L. A., Informaci, D. E. L. O. S. S. D. E., An, F. A. L., Riesgo, L. D. E., Am, E. N., Red, R. L., & Sociales, E. (1998). *Navegando entre brumas*.

Armonización, R. P. De. (2011). *Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica para laboratorios de microbiología*.

Asuar, L. E. (n.d.). *Guía práctica sobre la técnica de PCR*. 517–540.

Baggini, S. P. (2014). *Pruebas Bioquímicas de Trpificación bacteriana*. Obtenido de [https://bagginis.blogspot.com/2014/07/guia-practica-del-laboratorio\\_21.html](https://bagginis.blogspot.com/2014/07/guia-practica-del-laboratorio_21.html)

Bolaño, V. G., Macías, C., & Rojas, G. (2019). *Caracterización de los factores de riesgo químico y biológico en los laboratorios de morfología y microbiología de una universidad*  
*Chemical and biological risk factors characterization at morphology and microbiology laboratories of a university company in* . 14(2), 13–28.

Bosco, S. J. (2006). *Microbacterium esteraromaticum GNP-5 CON DIFERENTES*

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

*TEMPERATURAS Y OSMOLARIDADES Changes in Membrane Fatty Acids of Microbacterium esteraromaticum GNP-5 with Changes of Temperature and Osmolarity.*

Boué, E., Lourdes, M., Croublet, B., Belkis, A., Rosés, D. T., Arguello, B., & Romero, S. (2011). *Redalyc.EVALUACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO MOTILIDAD – INDOL MODIFICADO EN CPHEM DE GUANTÁNAMO.*

Cañon, J. (n.d.). *Capítulo iv glosario de términos y conceptos genéticos.* 1–7.

Carlos, J., Arboledas, A., & Molinero, E. R. (n.d.). *Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica.*

Carolina, V. (2016). *Tesis Doctoral Producción de sistemas lignocelulolíticos en Trametes y géneros relacionados ( grupo Trametes ). Posibles aplicaciones en biorremediación.*

Christopher P. Austin, M. (2022). *definición de fenotípico, National Human Genome Research Institute.* Obtenido de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Fenotipo>

Correa, M. (2016). *Bacillus cereus un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos.* <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v34n2a12>

Dolores, N., Fernández, P. De, Urueña, R., Cristina, M., Allori, G. De, Elena, M., & Castillo, C. De. (2013). *Staphylococcus cohnii productor de biofilm en una fábrica \**. 47(4), 693–700.

Esper, R. C., Ángeles, M. D. L., & Morales, T. (2000). *Staphylococcus xylosus : Una bacteria emergente.* 63(2), 107–111.

FAO, W. (2006). *Utilización de los resultados de la evaluación de riesgos microbiológicos para elaborar estrategias prácticas de gestión de riesgos: Parámetros para mejorar la inocuidad de los alimentos.* 3–7.

Funke, G., Aravena-roman, M., & Frodl, R. (2005). *First Description of Curtobacterium spp . Isolated from Human Clinical Specimens.* 43(3), 1032–1036.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1032>

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

- Gil, M. (2019). *Medio MIO: fundamento, preparación y usos*. Obtenido de <https://www.lifeder.com/medio-mio/>
- Humana, D. E. L. A. P., Angel, J., & Moreno, C. (2016). *Los hongos: héroes y villanos de la prosperidad humana*. 17, 1–10.
- Ja, C., Isernia, V., Ja, H., & Jc, M. (2018). *Artritis séptica de rodilla por Staphylococcus warneri*. 32(5), 287–290.
- Juan, A., & Reparaz, M. (n.d.). *TRABAJO FINAL Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en Trigo ( Triticum spp .) y Maíz ( Zea mays )*.
- Laboratorio., M. D. B. E. El. (1983). Tercera edición. *Manual De Bioseguridad En El Laboratorio.*, 3, 210.
- Lai, W., Ka, P., Arun, A. B., Shen, F., Huber, B., Rekha, P. D., & Young, C. (2006). *Deinococcus ficus sp . nov ., isolated from the rhizosphere of Ficus religiosa L .* 787–791. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.64007-0>
- LIU. (2020). *No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する分散構造分析Title*. 151–156.
- López, S. C. (2018). *El Concepto*. 4(1), 32–52.
- M1, M. G., & , Aparicio Egea C2, Z. H. D. (2007). *Bacteriemia por Staphylococcus hominis*. 2–3.
- Maldonado, I., Ramírez, D. G., Striebeck, P., & Lafage, M. (2017). Espectrometría de masas MALDI-TOF : evaluación de la etapa preanalítica para la identificación de hongos miceliales. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.001>
- Maldonado, N., Robledo, C., & Robledo, J. (2018). *La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica*. 22(1), 35–45.
- Mansilla, E. C. (n.d.). *Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en*

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

*Microbiología Clínica.*

MacWilliams, M. P. (2009). Indole Test Protocol. American Journal for Microbiology, December 2009, 1–9.

Microbiol, R., Colonias, A., Detalle, B., Baa-, A., & Baa-, A. (2012). *Kocuria spp.* 29(2), 215–216.

MINSA-INS. (2005). *Utilizacion de Citrato*. Obtenido de <http://identificacionbacterias.web16.top/pruebas-bacilos-g/utilizacion-de-citrato>

Monz, A., Rodr, J. L., Servicio, T., Nacional, C., & Iii, S. C. (1973). *GÉNERO Fusarium*.

Nováková, D., Sedláček, I., Pantůček, R., Štětina, V., Švec, P., & Nováková, D. (2006). *Staphylococcus equorumyestafilococo succinus aislado de especímenes clínicos humanos*. 523–528. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46246-0>

Oren, A. (2018). *Description and Comparative Genomics of Macrocooccus caseolyticus subsp . hominis subsp . Macrocooccus epidermidis sp . nov ., and Macrocooccus bohemicus sp . nov ., Novel Macrococci From Human Clinical Material With Virulence Potential and Suspected Uptake of Foreign DNA by Natural Transformation*. 9(June), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01178>

Patel, R. (2015). *Reviews MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases*. 111. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770>

Raquel De Los Ángeles, D., Díaz, J., Zulia, L., & Alemán, W. (2016). *Evaluación del riesgo biológico en el Departamento Microbiología Sanitaria del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología*. November 2014, 2014–2016.

Raquel Terragno et. alt. (2013). Bioseguridad en laboratorios de microbiología y biomédica. *Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health*, 4, 1–196. [https://www.uib.cat/digitalAssets/195/195210\\_cdc\\_bmbbl\\_4.pdf](https://www.uib.cat/digitalAssets/195/195210_cdc_bmbbl_4.pdf)

Reddy, G. S. N. (2007). *Sphingomonas desiccabilis sp . nov ., a partir de costras biológicas del*

# EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

*suelo en la meseta de Colorado , EE . UU . 1028–1034.*

<https://doi.org/10.1099/hielo.0.64331-0>

Reyes, M. (n.d.). *GENERALIDADES DE LOS RIESGOS BIOLÓGICOS. PRINCIPALES MEDIDAS DE CONTENCIÓN Y PREVENCIÓN EN EL PERSONAL DE SALUD.*

Reiner, K. (2016). Catalase Test Protocol. November 2010, 1–9.

Salvador, U. D. E. E. L. (2007). *No Title.*

Schippers, A., Bosecker, K., & Spro, C. (2005). *novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria.* 655–660. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63305-0>

Silva-vega, M., Bañuelos-valenzuela, R., Delgadillo-ruiz, L., Gallegos-flores, P., Mezalópez, C., Valladares-carranza, B., & Echavarría-cháirez, F. (2020). Chemical 42 characterization of alcoholic extract of guava leaf ( *Psidium guajava* ) and its effect as a mobility inhibitor for *Escherichia coli* O157 : H7 Caracterización química de extracto alcohólico de hoja de guayaba ( *Psidium guajava* ) y su efecto como i. December, 1–13.

Thomas, D. B. (2015). *Adiós al mal olor de tus axilas, la promesa de una nueva investigación.* New York. Obtenido de <https://expansion.mx/salud/2015/04/06/adios-al-mal-olor-de-tus-axilas-la-promesa-de-una-nueva-investigacion>

Trabajo, I. N. (2012). *Aspergillus fumigatus.* Obtenido de <https://www.insst.es/documents/94886/353749/Ficha+Aspergillus+fumigatus.pdf/d7472990-4622-42b4-a8ac-a9e56e0ddc45>

Vázquez, A., Alaya, I., Domenech, I., Martíniz, I., & Rodríguez, R. (2019). Riesgo biológico en los laboratorios de Microbiología de las instituciones de salud. *Panorama. Cuba y Salud*, 14(1), 65–70. <http://revpanorama.sld.cu/index.php/panorama/article/view/854>

V. Benvenuto. (2017). Determinación de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP).