

## 1. Título práctica de laboratorio:

### CONTROL MICROBIANO

Integrantes:

---

---

---

---

Código:

---

---

---

---

## 2. OBJETIVOS

### General

Evaluar la actividad antimicrobiana de antisépticos, desinfectantes y antibióticos usados comercialmente, frente a cepas bacterianas conocidas.

### Específicos:

- Determinar la efectividad de algunos desinfectantes y antisépticos químicos empleados en ambientes hospitalarios y en los hogares utilizando el método de difusión de disco en agar.
- Determinar la sensibilidad de una cepa bacteriana frente a un antibiótico comercialmente usado.
- Interpretar y correlacionar los resultados obtenidos por el método de Kirby-Bauer en las cepasevaluadas.

## 3. REFERENTES CONCEPTUALES

Los agentes antimicrobianos son empleados rutinariamente para controlar el crecimiento de los microorganismos (1). Dentro de los agentes antimicrobianos están incluidos:

- Agentes quimioterapéuticos: Son empleados para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas (Serán evaluados en otra práctica de laboratorio).
- Desinfectantes: Son empleados sobre superficies o materiales inanimados con el fin de disminuir el número de microbios en dicha superficie
- Antisépticos: Son empleados sobre un tejido vivo con el fin de disminuir su carga bacteriana.

Los agentes antimicrobianos afectan a los microorganismos gracias a diferentes mecanismos de acción, dentro de ellos está la capacidad de matar los microorganismos (Bactericida) y la capacidad de inhibir su crecimiento de forma temporal (Bacteriostáticos) (1, 2).

Hasta el momento no existe un agente antimicrobiano que pueda ser exitoso para el control en todas las circunstancias, deben ser evaluados individualmente para los microorganismos específicos, y en razón a la aparición de multiresistencia (resistencia a más de dos antibióticos) se debe llevar un registro y seguimiento de estas cepas. La concentración, el tiempo de acción, pH, solubilidad, toxicidad y costos, son aspectos importantes para su selección (2).

Existen muchos métodos para evaluar la efectividad de los agentes antimicrobianos, uno de ellos es el ensayo por difusión en agar o método Kirby-Bauer, donde un disco de papel filtro es impregnado con el agente químico a evaluar y es puesto sobre placas de cultivo previamente inoculadas de forma masiva con bacteria. Al incubar las placas, en las condiciones adecuadas, se permitirá el crecimiento bacteriano y la difusión del agente químico. Si un microorganismo es susceptible al agente químico, se podrá observar un halo de inhibición alrededor del disco, siendo el tamaño de este halo proporcional a la sensibilidad de la bacteria (3).

En el caso de los antibióticos, la medida en milímetros de cada halo de inhibición, indicará la susceptibilidad o resistencia de la cepa bacteriana frente a un antibiótico específico, y estando en una relación inversamente proporcional a la concentración mínima inhibitoria (CMI). Esos patrones de susceptibilidad obtenidos es lo que se denomina antibiograma (3). Es así que para un determinado antibiótico, una cepa bacteriana es:

- **Sensible:** Si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
- **Resistente:** Si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.
- **Intermedia:** Cuando el éxito terapéutico es imprevisible, pudiéndose conseguir éxito con altas concentraciones terapéuticas.

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se realizan para determinar la susceptibilidad de una cepa bacteriana frente a varios antibióticos, con el objetivo de prescribir el antibiótico que mejor se ajuste a la terapia (3). La terapia antimicrobiana está definida como el uso de agentes químicos que tienen la capacidad de inhibir (bacteriostático) o matar (bactericida) microorganismos gracias a su toxicidad selectiva, por lo tanto, el agente químico debe interactuar con algunas funciones o estructuras microbianas que no estén presentes en el hospedero, o que sean muy diferentes en el mismo (1).

Los agentes antimicrobianos que son efectivos frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas se denominan de amplio espectro, por el contrario, los que son efectivos tan sólo frente a Gram negativos o tan sólo frente a Gram positivos o incluso frente a unas pocas especies, son denominados de bajo espectro (1).

#### 4. CONSULTA PREVIA

- a. ¿Qué factores físicos pueden influir en la efectividad de un desinfectante?
- b. ¿Qué factores químicos pueden influir en la efectividad de un desinfectante?

- c. ¿A que hace referencia espectro de acción?
- d. ¿Qué es toxicidad selectiva?
- e. ¿Qué es concentración mínima inhibitoria?
- f. Describa la utilidad del método de Kirby-bauer.
- g. Haga una revisión de los antimicrobianos que van a utilizarse en la práctica (Cuadro de reactivos y equipos) y diseñe un cuadro comparativo donde involucre clasificación, mecanismo de acción y espectro de acción (Amplio/Bajo) donde involucre clasificación, mecanismo de acción y espectro de acción (Amplio/Bajo).

## 5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos (Grupo 3 o 4 de estudiantes)	Reactivos
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 Caldo <i>Pseudomonas</i> sp.</li> <li>• 1 Caldo <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• 1 Caldo <i>Enterococcus</i> spp.</li> <li>• 1 Caldo <i>Escherichia coli</i></li> <li>• 4 Cajas Agar Mueller Hinton</li> <li>• 3 Pinzas punta fina</li> <li>• 4 Hisopos estériles</li> <li>• 1 Gradilla para tubos de 10ml</li> <li>• 15 Discos de papel filtro estéril</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensidiscos para <i>Escherichia coli</i>: Cefalotina, gentamicina, amikacina, penicilina, tobramicina.</li> <li>• Sensidiscos para <i>Staphylococcus aureus</i>: Penicilina, eritromicina, ceftriaxona, trimetropin sulfa, amikacina.</li> <li>• Sensidiscos para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>: Amikacina, imipenen, gentamicina, eritromicina, tetraciclina.</li> <li>• Sensidiscos para <i>Enterococcus faecalis</i>: Penicilina, trimetropin sulfa, vancomicina, lincomicina, norfloxacin.</li> </ul>

### Materiales que debe traer el estudiante

Elementos de bioseguridad

Del siguiente listado debe seleccionar y llevar a su práctica tres antisépticos y tres desinfectantes (Por grupo de trabajo):

- Vinagre 10ml
- Hipoclorito de sodio 10ml Lysol 10ml
- Fabuloso 10ml Mertiolate 10ml Isodine 10ml
- Agua oxigenada 10ml Cresopinol 10ml
- Jabón antibacterial 10ml Detergente de ropa 10ml Bicarbonato de sodio 3g

## 6. PROCEDIMIENTO

Tendrá para el desarrollo de la práctica Caldo con bacterias en solución salina ajustados a la turbidez similar a 0,5 en la escala de McFarland.

La práctica se dividirá en dos sesiones: Montaje y Lectura.

## MONTAJE

### Ejercicio A: Sensibilidad a Antisépticos y desinfectantes

1. Para este ejercicio se utilizarán dos cepas: Una Gram. Positiva y una Gram. Negativa. Inicialmente rotule la caja con el nombre de la cepa y haga un bosquejo para evaluar de tres antisépticos y tres desinfectantes.
2. Junto al mechero encendido tome un hisopo estéril e introdúzcalo en el caldo de cultivo bacteriano. Elimine el exceso de inóculo presionando el hisopo saturado contra la pared interna del tubo de ensayo.
3. Inocule la superficie del agar Mueller Hinton haciendo una siembra masiva.
4. Deje por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente para permitir que la siembra seque.
5. Con mucha precaución esterilice la punta de la pinza humedecida con alcohol, con la ayuda del mechero.
6. Con la pinza estéril, recoja una pieza de papel filtro estéril y humedézcala con la primera solución, evitando que los discos queden muy saturados de solución. Coloque la pieza de papel cuidadosamente sobre el agar inoculado, presionando el disco sobre el agar con la punta de las pinzas estériles y así asegurar el contacto con el agar, y distribúyalos de manera equidistante. Repita el procedimiento con cada químico, recuerde que debe completar tres antisépticos y tres desinfectantes.
7. Deje en reposo 15 minutos y /o hasta que no vea líquido alrededor de los sensidiscos, con la caja a medio tapar y cerca al mechero.
8. Tape la caja e incúbela a 37°C durante 24 horas.

### Ejercicio B: Sensibilidad a antimicrobianos

1. Para este ejercicio se utilizarán dos cepas: Una Gram. Positiva y una Gram. Negativa. USE LAS MISMAS CEPAS DEL EJERCICIO A.
2. Inicialmente rotule la caja con el nombre de la cepa y haga un bosquejo para de tres antisépticos y tres desinfectantes.
3. Rotule la placa con el nombre de la cepa utilizada y haga un bosquejo para siembra de seis antibióticos.
4. Humedezca un hisopo estéril con la suspensión del microorganismo previamente preparada, elimine el exceso de inóculo presionando el hisopo saturado contra la pared interna del tubo de ensayo.
5. Con este hisopo inocule la placa, completamente, de forma masiva, con el fin de asegurar que el microorganismo crezca de forma homogénea a través de toda la superficie del agar.
6. Incube de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente para permitir que la placa seque.
7. Usando las pinzas, previamente esterilizadas en el mechero, ubique los sensidiscos correspondientes de la bacteria en cuestión (revise la tabla de materiales, reactivos y equipos) sobre la superficie de la placa de agar inoculada, distribuyéndolos de manera equidistante.
8. Suavemente presione cada disco sobre el agar con ayuda de la pinza para asegurar que el disco se adhiera a la superficie del agar. Tenga cuidado de no enterrar el disco en el medio de cultivo.
9. Incube la placa durante 24 a 48 horas a 37°C.

## LECTURA

Para el ejercicio A y B, tenga en cuenta lo siguiente:

- Con una regla medir en milímetros el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano, incluyendo el sensidisco.
- Diligencie las tablas de resultados del anexo 1 con los hallazgos obtenidos.
- Para informar sí la cepa bacteriana evaluada es susceptible, intermedio o resistente a los antimicrobianos probados, consulte las tablas del NCCLS actualizadas (disponibles on line).

**Disposición de desechos: Al final de la lectura, disponga los residuos en la bandeja de material contaminado.**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Cain D, Hanks H, Weis M, Bottoms C y Lawson J. Microbiology Laboratory Manual. 2013; [117 páginas]. Accesible in URL:<http://www.swtc.edu:8082/mscenter/mthsci/science/1tools/p02amtrc.pps>. consultada el 26 de enero de 2015
2. Cappuccino J y Sherman N. Microbiology: a Laboratory Manual. 6 ED. San Francisco. Benjamin Cummings. 2001
3. Harley J, Prescott L. Laboratory Exercises in Microbiology. 5 ED. The McGraw-Hill Companies. 2002

## INFORME DE LABORATORIO

---

Integrantes:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Código:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### TABLA DE RESULTADOS (1.5/5.0)

Con los resultados obtenidos y observaciones durante el desarrollo de la práctica, complete las siguientes tablas de resultados:

**Tabla 1.** Resultados de antisépticos y desinfectantes

NOMBRE DEL QUÍMICO	CATEGORIA (DESINFECTANTE/ ANTISÉPTICO)	NOMBRE CEPA BACTERIANA (Halo mm)	
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
OBSERVACIONES:			

**Tabla 2. Resultados Antibióticos**

NOMBRE DEL ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN	NOMBRE DE LA BACTERIANA			
		(Halo mm)	(SENSIBLE/INTERMEDIO, RESISTENTE)	(Halo mm)	(SENSIBLE/INTERMEDIO, RESISTENTE)
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
OBSERVACIONES:					

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS (2.0/5.0)

Realice un análisis, correlacionando los resultados obtenidos y los conceptos teóricos que soportan la práctica. La discusión de resultados tiene un componente altamente teórico y es necesario que la información que soporte esta sección sea citada y verificada en función de utilizar las referencias pertinentes para el caso.

### CONCLUSIONES (1.0/5.0)

Presente la conclusión en forma de un único párrafo en el que se incluya los hallazgos de la práctica con su respectiva justificación teórica, y las habilidades personales adquiridas durante el desarrollo del laboratorio como aporte al ejercicio profesional.

### BIBLIOGRAFÍA (0.5/5.0)

Ingrese la lista de referencias utilizadas para la resolución del informe. Cite de acuerdo con la norma Vancouver.