



CONTROL DE
MICROORGANISMOS POR
AGENTES
ANTIMICROBIANOS

MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

INDICE

AGENTES ANTIMICROBIANOS: 3
 Definición: 3
 Pueden clasificarse: 3
ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES: 3
 Modo de acción: 4
 Usos: 4
Condiciones que debe reunir un antimicrobiano ideal: 5
Clasificación: 5
 1) Antisépticos inorgánicos: 5
 2) Antisépticos orgánicos: 6
Factores que influyen sobre la actividad antimicrobiana: 8
Cuantificación de efecto antimicrobiano: 9
 Pruebas por dilución en caldo: 9
 TÉCNICA: 10
 CÁLCULO DE LA CIM: 10
 CÁLCULO DE LA CBM: 11
Esquema de trabajo a desarrollar en el práctico: 11
Interferencia de la materia orgánica en la actividad de un desinfectante: 12

AGENTES ANTIMICROBIANOS:

Definición:

Sustancias capaces de destruir o inhibir la proliferación de los microorganismos.

Estos compuestos actúan sobre determinados sitios del microorganismo produciendo modificaciones estructurales, o inhibición de la síntesis de componentes esenciales para la vida, alterando la integridad celular o la división bacteriana.

Pueden clasificarse:

- ❖ **Desinfectantes:** sustancias químicas empleadas para matar microorganismos sobre superficies u objetos inanimados, pero son tóxicos al aplicarlos directamente sobre tejidos.
- ❖ **Antisépticos:** germicida inofensivo para aplicar sobre la piel y/o mucosas, pero no lo suficientemente inofensivo como para ser ingerido. Se utiliza en la asepsia de heridas o campos quirúrgicos.
- ❖ **Antibióticos:** sustancias químicas producidas por microorganismos o también obtenidas por síntesis química, ya sea total o parcialmente. En bajas concentraciones inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Los antibióticos son utilizados como agentes quimioterápicos en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Se los llama quimioterápicos porque tienen toxicidad selectiva sobre el microorganismo, es decir, no presentan efectos nocivos acentuados sobre el huésped.

De acuerdo a la concentración empleada, estas sustancias pueden actuar como agentes:

- ❖ **Germicidas o bactericidas:** sustancia que destruye o mata los microorganismos.
- ❖ **Bacteriostáticos:** sustancia que impide el crecimiento y multiplicación de bacterias. La mayor parte de las sustancias bactericidas, a bajas concentraciones se comportan como bacteriostáticos.

ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES:

Modo de acción:

1. Precipitación y desnaturalización de proteínas del protoplasma que se encuentran en estado coloidal, fragmentando la estructura terciaria de las mismas. Ejemplo: fenol y etanol.

2. Combinación e inactivación de enzimas bacterianas con grupos SH, que únicamente pueden funcionar si estos grupos permanecen libres y reducidos.

Ejemplo: compuestos de mercurio.

3. Oxidación de enzimas. Ejemplo: H₂O₂.

4. Combinación con grupos amínicos de las proteínas bacterianas. Ejemplo: formaldehído.

5. Alteración de las propiedades físicas y químicas de la membrana celular. Impidiendo su funcionamiento normal. Ejemplo: antisépticos detergentes.

6. Combinación de grupos ácidos y básicos del protoplasma bacteriano y nucleoproteínas. Ejemplo: colorantes básicos y ácidos respectivamente.

El problema cuando se quiere desinfectar material no viviente es diferente que cuando se trata de tejidos vivos.

En el primer caso deben destruirse todos los gérmenes, es decir efectuar la esterilización, porque si se dejan vivas algunas bacterias, se reproducen rápidamente, luego es necesario un desinfectante muy potente.

En el segundo caso, los tejidos vivos poseen medios de defensa contra la invasión bacteriana. Por ello, el objetivo del empleo de antisépticos y otras drogas anti infecciosas es de ayudar a dichas defensas, siendo muchas veces suficiente inhibir el crecimiento de los gérmenes (acción bacteriostática). Deben buscarse drogas que dañen las bacterias y a la vez afecten lo menos posible los tejidos del huésped.

Usos:

- Antisepsia de la piel sana: se refiere, por ejemplo, a la antisepsia de las manos del cirujano. En estos casos es necesario la acción en forma rápida, no sólo de la superficie sino también de las glándulas sebáceas y sudoríparas.
- Antisepsia de heridas pequeñas (en heridas grandes se corre el peligro de absorción) y mucosas (previando el uso de antisépticos poco irritantes y que no sean absorbidos por la mucosa tratada).
- Desinfección de objetos inanimados.
- Desinfección del agua (se debe recurrir a sustancias que no sean tóxicas ni de sabor desagradable).

Condiciones que debe reunir un antimicrobiano ideal:

- ✓ Poseer actividad potente contra todos los microorganismos.
- ✓ De acción rápida.
- ✓ Inocuo para el hombre y los animales.
- ✓ Eficaz en presencia de materia orgánica.
- ✓ Capacidad de penetración.
- ✓ Soluble en agua.
- ✓ Estable.
- ✓ Sin olor desagradable.
- ✓ No ser corrosivo ni manchar.
- ✓ Económico y de fácil adquisición.

CLASIFICACIÓN

1) Antisépticos inorgánicos.

Halogenados:

* Iodo y derivados: Acción germicida potente y rápida. Actúa sobre bacterias, esporos, hongos, virus y amebas. Se combina con las proteínas bacterianas precipitándolas. Es inactivado por la materia orgánica por combinación con proteínas. Ej.: solución de iodo, povidona iodo. Se combina con proteínas de la sangre formando ioduros inactivos por lo que no se recomienda para antisepsia de heridas profundas. Muy potente para antisepsia de piel.

*Cloro y derivados: Germicida de acción potente sobre bacterias, virus, amebas y esporos. Estas sustancias se transforman en ácido hipocloroso (ClOH) que reacciona con los grupos aminos de los aminoácidos de las proteínas bacterianas, formando cloraminas, o por monooxidación ya que el ClOH libera oxígeno fácilmente, poder desodorizante. Ej: cloro que se utiliza comprimido en tubos de acero al estado líquido para desinfección del agua, Hipoclorito.

Antisépticos oxidantes:

*Agua oxigenada: germicida, los microorganismos más sensibles son los anaerobios. El mecanismo de acción consiste en la oxidación de los grupos sulfhidrilos libres de las enzimas bacterianas, ligando grupos sulfhidrilos vecinos, dando lugar a puentes de disulfuro. Se produce así, cambios en la conformación de las proteínas que forman dichas enzimas, pérdida de función y muerte celular.

*Permanganato de potasio tiene mayor poder oxidante que el anterior y su acción es inespecífica. Actúa sobre bacterias, virus, trichomonas.

Metales pesados:

*Compuestos de mercurio. Son bacteriostáticos, necesitan mucho tiempo para actuar y son poco activos frente a esporos. Los iones mercúricos se adsorben a la pared bacteriana, luego penetran. En el caso de soluciones concentradas, se combinan con las proteínas del protoplasma precipitándolas. En soluciones diluidas se ha demostrado que la acción se realiza sobre sistemas enzimáticos que tienen grupos sulfhidrilos de gran importancia metabólica, inactivándolos por combinación con éstos grupos. Los iones mercúricos son removidos de estos sitios por sulfuros o compuestos que tengan este grupo reactivándose el metabolismo bacteriano, de allí su acción bacteriostática. Ej: cloruro mercúrico, óxido mercúrico, timerosal o merthiolate.

*Compuestos de plata: Germicidas potentes y rápidos, en soluciones diluidas son bacteriostáticos. Tienen igual modo de acción que el mercurio. Ej: Nitrato de plata, solución oftálmica de nitrato de plata (en oftalmología del recién nacido).

*Compuestos de zinc y cobre: Bacteriostáticos, igual que el mercurio. Ej: Sulfato de Zinc, Sulfato de cobre, Solución cuprozíncica alcanforada (agua Dalibour).

Ácidos inorgánicos:

*Acido bórico: se utiliza en la dermatofitosis del tipo pie de atleta. Es Bacteriostático, y su acción no está completamente dilucidada.

2) Antisépticos orgánicos.

Alcohol:

*Alcohol etílico: acción germicida, efectivo contra bacterias, con menor acción sobre virus y muy poca sobre esporos. La mejor concentración es al 70° debido a su mayor penetración en el protoplasma bacteriano. El alcohol puro (96°) coagula las proteínas en la superficie celular y se hace difícil la penetración; en condiciones de hidratación la penetración es más fácil. El alcohol desnatura las proteínas del protoplasma bacteriano.

*Fenoles: Acción germicida, penetran fácilmente, utilizados en solución acuosa, atraviesan fácilmente la membrana celular bacteriana. En altas concentraciones se combinan y coagulan las proteínas protoplasmáticas desnaturizándolas. En bajas concentraciones actúan por inactivación de sistemas enzimáticos. Su potencia es poco afectada por la materia orgánica.

Aldehídos:

*Formaldehído: potente germicida de acción bastante lenta, contra toda clase de microorganismos, inclusive esporas. Precipita las proteínas y tiene la capacidad de inactivar las toxinas transformándolas en toxoides, sin perder las características antigénicas. Su acción se debe a la combinación con grupos aminos libres de las proteínas, desnaturizando la proteína que coagula. Sus soluciones son tóxicas, irritantes en ojos y mucosas.

*Glutaraldehído y derivados: actúan del mismo modo del formaldehído. Necesita una activación a pH alcalino para que sea efectivo.

Ácidos orgánicos:

*Ácido mandélico: utilizado exclusivamente como antiséptico urinario, siendo bactericida para bacterias Gram negativas y derivados.

Detergentes aniónicos:

*Jabones: son agentes tensioactivos. Tienen un grupo hidrofílico y un grupo lipofílico. Son sales metálicas de ácidos grasos superiores de cadenas largas. Los ácidos pueden ser saturados o no saturados. Poseen acción germicida, actúan sobre la membrana celular donde se concentran (interfase líquido-agua) y la lesionan alterando su permeabilidad. También ejercen acción de arrastre.

Detergentes catiónicos:

* Compuestos de amonio cuaternario: se caracterizan porque el grupo lipofílico lleva carga positiva (catión). Los compuestos de amonio son de origen sintético. Son germicidas para bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y protozoarios. En bajas concentraciones se comportan como bacteriostáticos. Son antagonizados por los detergentes aniónicos. Actúan de igual forma que los anteriores, además inhiben enzimáticos que actúan en la respiración, rigen las glucólisis y desnaturalización de las proteínas.

Colorantes:

* Se combinan con constituyentes ácidos como nucleoproteínas y ácido fosfórico. Ej. Violeta de genciana, verde de malaquita y violeta de metilo.

Factores que influyen sobre la actividad antimicrobiana:

1. **Tiempo de contacto:** la muerte microbiana no es un proceso instantáneo por lo que resulta indispensable no sólo elegir el agente letal, sino establecer correctamente el tiempo mínimo que debe aplicarse para lograr el efecto deseado. El tiempo necesario para matar los microorganismos presentes es proporcional a la concentración inicial, es decir que se requiere mayor tiempo para matar altas concentraciones de microorganismos. Por esto es de gran importancia reducir la carga inicial de microorganismos de los materiales a desinfectar mediante operaciones previas de LIMPIEZA.
2. **Concentración:** la concentración del antimicrobiano se relaciona, en forma exponencial, con el tiempo de contacto. Es decir que cuando menor sea la concentración del desinfectante mayor será el tiempo de exposición necesario para que el proceso sea efectivo.
3. **Temperatura:** algunos compuestos aumentan su actividad con la temperatura pero otros, principalmente los desinfectantes reductores no son afectados.
4. **pH:** influye en el grado de disociación de moléculas activas. Cada grupo de desinfectantes tiene un pH óptimo de acción. Por ejemplo:
 - a. Sales de amonio cuaternario: pH neutro o ligeramente alcalino.
 - b. Cloro: pH neutro o ácido.
 - c. Glutaraldehído: pH alcalino.
5. **Influencia de sustancias presentes,** principalmente materia orgánica: para que el desinfectante actúe, debe ponerse en contacto con el microorganismo. La suciedad, grasa, proteínas y materia orgánica, en general constituyen BARRERAS que impiden el contacto protegiendo al microorganismo.
6. **Espectro antimicrobiano:** algunas sustancias son muy específicas con respecto a los microorganismos que afectan y otros tienen un amplio espectro antimicrobiano.

Las células jóvenes y metabólicamente activas son más sensibles que las células viejas o en estado de reposo.

7. **Estabilidad del desinfectante:** en general los desinfectantes son estables en sus formulaciones originales y sin diluir. Luego de la dilución sufren alteraciones graduales con pérdida de actividad por lo que se recomienda siempre usar diluciones recientemente preparadas que no deben almacenarse.

8. **Resistencia microbiana:** la composición de la pared ofrece una gran variación de efectos a los desinfectantes.

9. **Incompatibilidades e inactivación:** como se expuso en el punto 6, la presencia de ciertas sustancias pueden inactivar el desinfectante empleado. Entre los ejemplos de incompatibilidad tenemos a las gomas y plásticos que inactivan desinfectantes fenólicos (por lo tanto no pueden ser almacenados en recipientes plásticos ni pueden ser utilizados para desinfectar este tipo de material) o los detergentes aniónicos que inactivan otros antisépticos como nitratos, halogenados, permanganato y cromato. Por lo tanto no pueden ser usados en forma combinada.

CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO

PRUEBAS POR DILUCION EN CALDO:

Características del método:

- Es un método cuantitativo mediante el cual puede determinarse la concentración del agente antimicrobiano necesario para inhibir o matar un microorganismo dado.

- No está influenciadas por la velocidad de crecimiento de los microorganismos en estudio, por lo tanto puede utilizarse tanto para microorganismos de rápido como de lento desarrollo.

- Se utiliza para bacterias aerobias y anaerobias.

- Sólo se aplica a cultivos puros.

Fundamentos del método:

En los métodos de dilución en caldo se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano en tubos con un caldo nutritivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. Aquellos tubos en los que la concentración de antimicrobiano no es efectiva aparecerán turbios por el crecimiento bacteriano.

Consideraciones a tener en cuenta:

- El caldo más comúnmente usado para estas pruebas es el de Mueller Hinton.
- Los agentes antimicrobianos se preparan en soluciones concentradas en un diluyente apropiado y luego se diluyen hasta obtener las concentraciones apropiadas (generalmente diluciones al medio).
- El inóculo estándar del microorganismo es, con mayor frecuencia de 1×10^6 mo/ml, que corresponde con el tubo N° 0,5 de la escala de Mc Farland.

TÉCNICA

- Se seleccionan 4 o 5 colonias del mismo tipo morfológico.
- Se prepara una suspensión de microorganismos en el caldo MH, con turbidez que represente 1×10^6 mo/ml.
- Se preparan las diluciones a probar del antimicrobiano y se coloca 1 ml de cada una de ellas en tubos estériles perfectamente rotulados con la concentración probada correspondientemente.
- A cada tubo anterior con antimicrobiano se le agrega 1 ml de la suspensión bacteriana (tener en cuenta que la concentración del antimicrobiano se diluirá a la mitad).

Se utilizan dos tubos control:

1. Caldo sin inocular como **control negativo** en la lectura de los resultados. También es útil para controlar posible contaminación.
2. Caldo inoculado pero sin antimicrobiano como **control positivo** de desarrollo y de utilidad en el cálculo de la CBM. De este tubo se realiza un recuento bacteriano en una placa de agar nutritivo.

Los tubos son incubados adecuadamente.

CÁLCULO DE LA CIM

Se observa la turbidez de los tubos por comparación con el control negativo.

El microorganismo crecerá en el control positivo y en todos los tubos que no contengan suficiente agente antimicrobiano como para inhibir el desarrollo, con estos resultados se calcula la CIM:

CIM: está dada por la menor concentración del agente que presenta falta de turbidez.

A cada tubo que no presenta turbidez se le realiza un recuento en placa para hallar la CBM.

CÁLCULO DE LA CBM

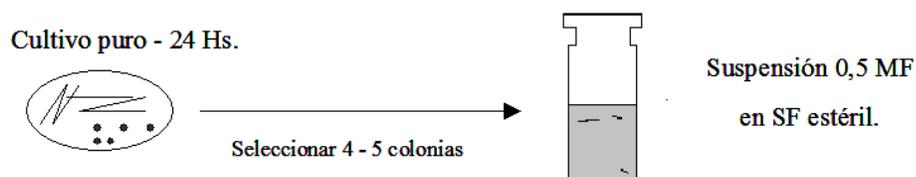
Se comparan los valores de los recuentos obtenidos de los tubos negativos con el del tubo considerado control positivo (éste nos da la cantidad de bacterias inoculadas y representa el 100%). De esta forma se calcula el porcentaje de crecimiento se obtuvo de cada tubo sin turbidez.

CBM: está dada por la menor concentración del antimicrobiano que permite el crecimiento del 0,1% de los microorganismos inoculados originalmente.

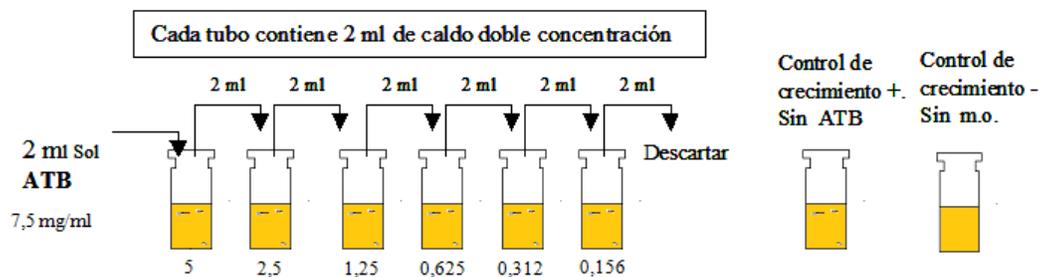
ESQUEMA DE TRABAJO A DESARROLLAR EN EL TRABAJO PRÁCTICO:

DIA 1

A) PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DEL MICROORGANISMO

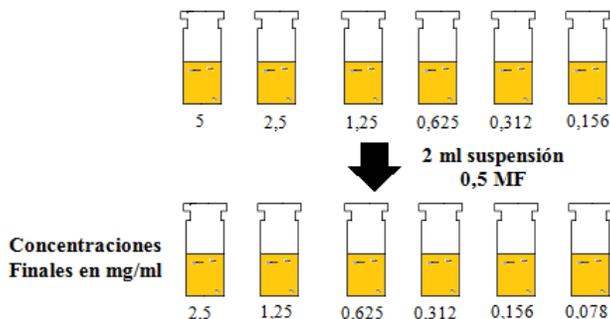


B) PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DEL ATB-CALDO



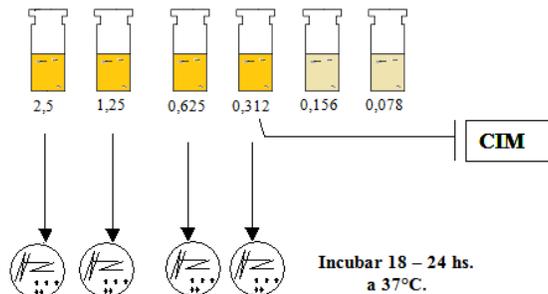
C) SIEMBRA

Agregar a todos los tubos (excepto el **control negativo**) 2 ml de la suspensión del microorganismo preparada en A). Incubar 18-24 HS. a 37°C.



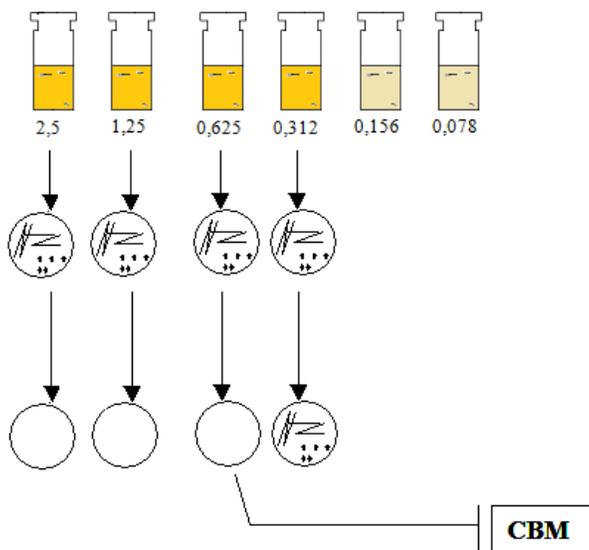
DIA 2

D) LECTURA CIM – SIEMBRA CBM



DIA 3

D) LECTURA CBM



Interferencia de la materia orgánica en la actividad de un desinfectante:

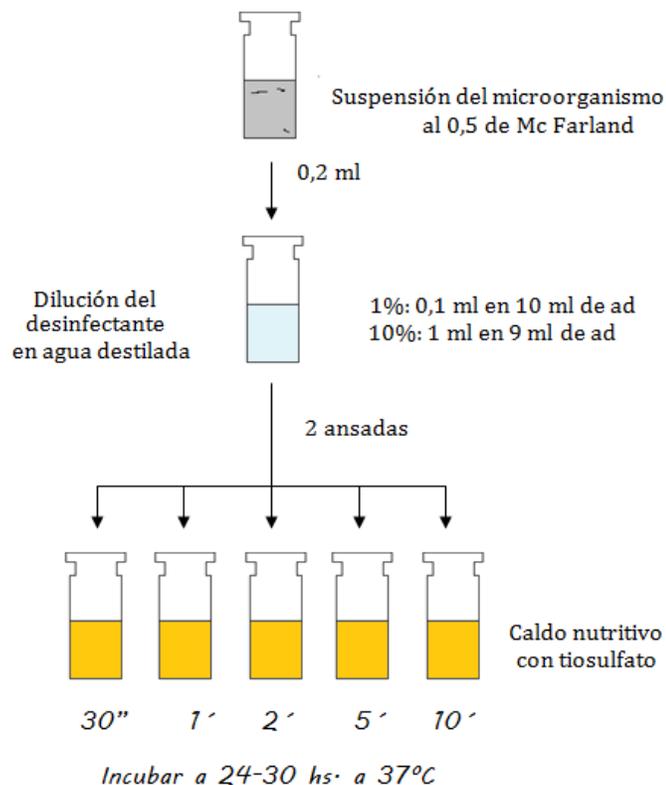
Objetivo:

Determinar cómo varía el tiempo de contacto necesario para que el desinfectante sea efectivo en presencia de materia orgánica.

Materiales:

- Microorganismo de prueba: *Escherichia coli*.
- Desinfectante de prueba: Hipoclorito de sodio
- Concentración de prueba: 1% - 10%
- Medio de cultivo: caldo nutritivo con tiosulfato de sodio como inactivante.

Técnica:



Repetir el esquema de trabajo anterior realizando diluciones del desinfectante en leche.

Luego de la incubación aquellos tubos que presentan turbidez visibles al compararlo con un tubo sin sembrar, se considerarán con desarrollo, es decir el **desinfectante no cumplió su función en el tiempo de contacto ensayado**.