

Agentes antimicrobiales

Objetivos:

1. Introducir sobre los agentes antimicrobiales.
2. Repasar el método Kirby-Bauer para ver el efecto de agentes antimicrobiales en el crecimiento de la bacteria aislada de la orina.
2. Ver la actividad antimicrobial de los agentes usados en su desconocido aislado de la orina.

I. Agente quimioterapéuticos

Estos son químicos usados para afectar una condición sin aquejar al paciente. Bajo los agentes quimioterapéuticos se encuentran los agentes antimicrobiales los cuales son usados para tratar microorganismos que son patógenos. El efecto de los agentes antimicrobiales depende de la toxicidad, el espectro de actividad, el modo de acción, los efectos secundarios y la resistencia que pueda tener el microorganismos al mismo. Por ejemplo, en algunos casos el agente es muy fuerte o toxico para suministrarlo interno al paciente, así que, se usa de forma tópica. Los agentes antimicrobiales que se pueden suministrar internamente deben ser unos que tengan una toxicidad selectiva que quiere decir que afecte al patógeno pero no al hospedero. Al referirse el espectro de actividad del agente es el rango de diversos microorganismos que pueden ser afectados por el agente. Hay agentes que tiene un amplio espectro porque puede afectar un grupo grande de microorganismo como es las tetraciclinas, la kanamicina, cloranfenicol entre otros. Sin embargo, los agentes antimicrobiales de poco espectro como la penicilina G, estreptomycin y vancomicina su efecto es reducido a un pequeño número de microorganismos. El modo de acción del agente es cómo impacta el compuesto al microorganismo. Esta el agente que inhibe la síntesis de la pared celular, otros irrumpe la membrana celular, o afecta la síntesis de proteínas. Los agentes antimicrobiales puede ocasionar secuela en el paciente desde toxicidad, alergias hasta efectos adversos en la microbiota normal del hospedero. Hay microorganismos ya no es susceptible al agente aunque en algún momento lo fue. Esta resistencia al agente puede ser adquirida por cambios genéticos de los microorganismos como por mecanismos no genéticos. Un ejemplo que mecanismo no genético es que el microorganismo este encapsulado o secuestrado en un ambiente del hospedero que no permite el contacto del agente antimicrobial con el patógeno. Este mecanismo es conocido como evasión y hace que el microorganismo este aislado reproduciéndose sin ser afectados por el compuesto. Otro ejemplo de mecanismos de resistencia no genético es dejar de producir pared celular para no ser afectadas por compuesto que interfieran la síntesis de la misma. Este cambio se conoce como bacteria forma de L y puede ser realizada por Gram positivas como Gram negativas. Este cambio puede ser reversible. La resistencia por mecanismos genéticos ocurre por mutaciones espontaneas y los agentes antimicrobiales pueden favorecer las mismas por el ambiente que crean alrededor del microorganismo. También resistencia por mecanismo genético es la adquisición de plásmidos que es ADN extracromosomal.

Hay varios agentes antimicrobiales: agentes antivirales, agentes anti parasíticos, anti fungicidas y antibacteriales. Los agentes antivirales son agentes que afectan los virus sin afectar las células hospedero. Están idoxuridina y trifluridina que son análogos de pirimidina y purina que

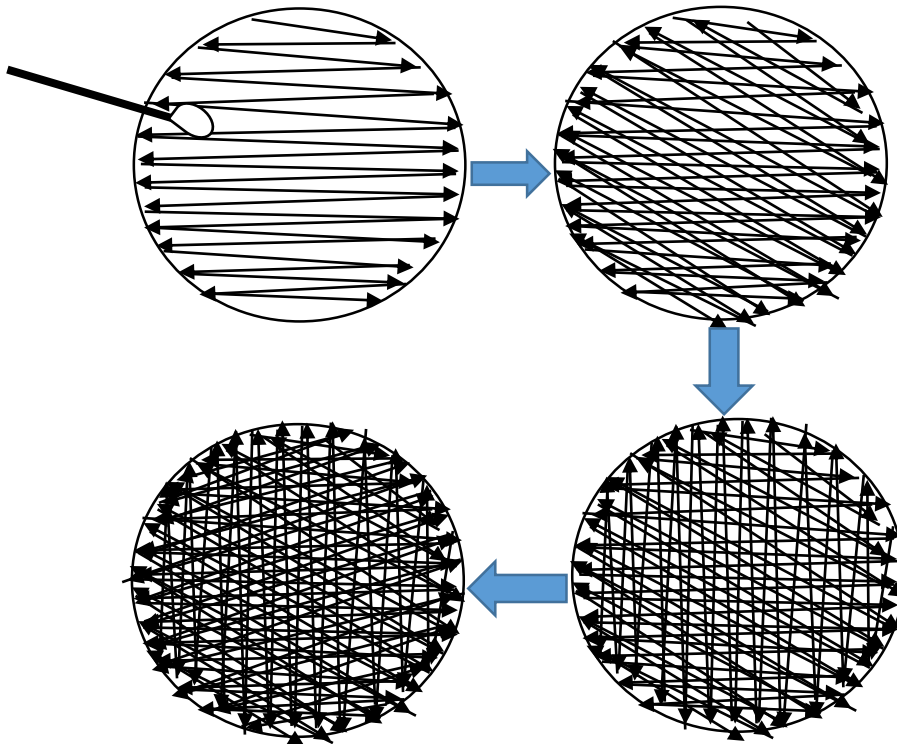
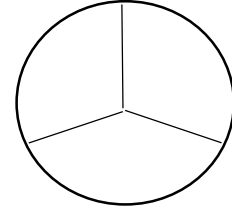
ocasiona que el ácido nucleico sea sintetizado erróneo. Esta amatidina que evita que el virus entre a la célula. Además están los interferones (proteínas que las células infectadas por el virus producen para indicar al resto de las células que produzcan proteínas antivirales contra el virus) que se han sintetizado por ser un modo natural del cuerpo para combatir el virus. Por otra parte, los agentes anti parasíticos son compuestos que pueden controlar o curar infecciones causadas por parásitos. Hay anti parasíticos que evitan que el parásito pueda metabolizar células de nuestra sangre como son la cloroquinonas y otros rompen las hebras de ADN del material genético del parásito como lo hace metronidazole. Los agentes antifungicidas son compuesto que impide o inhiben el crecimiento de los hongos, pero pueden causar mucho efectos secundarios al hospedero. Ejemplos de antifungicidas son las imidazoles, triazoles, polienes, amfoterecina B, nistatina, griseofulvina y flicitosine. Los antifungicidas pueden afectar la membrana plasmática, el ergosterol (molécula que produce los hongos y algunas algas y protozoario), la división celular, y la síntesis de proteína y ácido nucleico. Bajo los agentes antimicrobiales se encuentran los antibióticos. Los antibióticos son compuestos que son producidos por microorganismos como bacterias, hongos y actinomicetos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Por ejemplo, las cefalosporina la produce especies del hongo *Cephalosporium*, penicilina es producida por *Penicillium griseofulvum*, *P. notatum* y *P. chrysogenum*. La eritromicina, cloramfenicol, kanamicina, estreptomycinina la producen diferentes especies de *Streptomyces*. La bacitracina la produce *Bacillus lincheniformis*. Muchas de estas sustancias ya son semi sintetizadas o modificados en los laboratorios. El efecto del antibiótico varía desde síntesis de pared celular de la bacteria, dañar la membrana celular o inhibir la síntesis de proteína y de ácido nucleicos.

II. Método de difusión

El método Kirby-Bauer también conocido como el método de difusión, permite ver sensibilidad de la bacteria a agentes antimicrobiales. Esta técnica permite ver cual sustancia es efectiva contra la bacteria que puede ser patógena. La técnica se lleva a cabo usando un disco de papel impregnado de la sustancia colocada en un medio que usualmente es Mueller-Hilton luego de inocular la bacteria. El agente antimicrobial impregnado en el disco se difumina a través del agar y su difusión depende de su peso molecular. Luego de un periodo de incubación de 16 a 18 horas se observa si no hay crecimiento de la bacteria alrededor del disco que se conoce como halos de inhibición o zona de inhibición. A estos se le mide el diámetro que es ocasionado por la sensibilidad de la bacteria hacia el antibiótico. Si no se observa el halo de inhibición o si el mismo es pequeño se interpreta que la bacteria es resistente al antibiótico. La medida del halo de inhibición es comparada con las medidas ya establecidos por el fabricante. Hay factores que pueden afectar la interpretación de la prueba: el tamaño del inoculado, el tiempo de incubación, la razón de difusión del antibiótico en el medio, la concentración del antibiótico, la razón de crecimiento de la bacteria y el grosor del medio. Se recomienda que el medio sea de 5mm de grosor y que al momento de usarse no tenga humedad en la superficie del agar. Aunque se vea inhibición de la bacteria en los platos, no necesariamente el agente va hacer efectivo para controlar la infección porque hay procesos metabólicos del hospedero puede interferir con la efectividad del agente.

III. Práctica del método de Kirby-Bauer

1. Corrobora que el medio está a temperatura ambiente y sin humedad en la superficie del agar. Para esto se puede colocar los platos por 10-20 minutos en una incubadora a 37°C con la tapa del plato Petri un poco abierto. También puede colocar los platos en gabinete microbiológico encendido con la luz UV con los platos medios abiertos para que se sequen.
2. Rotule por la parte de abajo del plato con sus iniciales, fecha, Biol 4375L sección. Divida el plato Petri en tres zonas usando un marcador permanente. Rotule cada zona con el nombre de uno de los antibióticos.
3. Inocule su bacteria crecida en caldo usando un hisopo estéril por toda la superficie del medio haciendo zig-zag de un lado al otro lado del plato sin dejar mucho espacio entre zig-zag. Rote el plato 45 grados y vuelva a realizar zig-zag. Hacer esta rotación cuatro veces. Descarte el hisopo usado en el zafacón de material biológico peligrosos.



4. Dejar reposar y secar por 5 minutos.
5. Usando unas pinzas previamente esterilizadas con alcohol y flameadas, coloque uno de los discos en la zona designada.
6. Presione suavemente el disco para que se adhiera al medio.
7. Flamee la pinza, luego la sumerge en alcohol y nuevamente flamee para esterilizarla.
8. Coloque otro antibiótico en otra de las zonas. Realice el paso 6 y 7 nuevamente.
9. Coloque el tercer disco de antibiótico en la zona restante.
10. Incubar de 24 a 48 horas.

11. Mida el diámetro de los halos de inhibición en mm usando una regla y retrate el plato para la libreta y reporte.
12. Descarte el plato en el zafacón de material no peligroso.

Referencias

Black, J.G. (2012). Antimicrobial therapy. In: *Microbiology: Principles and explorations* (8^{va} ed., pp. 364-397). NJ: John Wiley & Sons, Inc.

Cappuccino, J.G. & Sherman, N. (1996). *Microbiology: a laboratory manual* (4^{ta} ed.). Menlo Park, California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Harley, J.P. & Prescott, L.M. (2002). *Laboratory Exercises in microbiology* (5^{ta} ed.). New York: McGraw-Hill.

Leaver, M., Dominguez-Cuevas, P., Coxhead, J.M., Daniel, R.A. & Errington, J. (2009). Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis*. *Nature*, 457, 849-853. Recuperado de <https://www.nature.com/articles/nature07742>.