

II. Desinfección y Esterilización.

Agentes químicos: conceptos generales

Un agente químico es **cualquier elemento o compuesto químico, por sí solo o mezclado**, tal como se presenta en estado **natural** o es **producido**, utilizado o vertido (incluido el vertido como residuo) en una actividad laboral, se haya **elaborado o no** de modo **intencional** y se haya **comercializado o no**.

Existen ciertas sustancias químicas que **influyen negativamente** sobre las **bacterias**, pudiendo ejercer **dos tipos de efectos** diferentes:

Bacteriostáticos: cuando *impiden el crecimiento* bacteriano.

Bactericidas: cuando *destruyen (matan)* las bacterias.

Si nos referimos no solo a las bacterias, sino a cualquier tipo de microorganismos, hablamos respectivamente de agentes **microbiostáticos** y **microbicidas**.

Para una misma sustancia química, la línea de demarcación entre un **efecto** microbiostático y otro microbicida depende muchas veces de la **concentración de dicha sustancia** y del **tiempo durante el que actúa**.

¿Cómo podemos saber que un microorganismo está “muerto”?

Por la **pérdida irreversible** de la **capacidad de división celular**, es decir, de la pérdida de **viabilidad**, y se suele **comprobar** empleando técnicas con **placas de Petri** (es decir, confirmando que no crecen en medios sólidos adecuados).

Todos los días usamos agentes químicos para controlar el crecimiento microbiano:

Ejemplos de Agentes químicos



Detergentes y jabones para el cuerpo y la ropa.



Cloración de las aguas potables.



Antisépticos para la piel y el tratamiento de heridas.



Quimioterápicos y antibióticos para tratar enfermedades bacterianas.



Desinfectantes para tratar superficies en los laboratorios y en la industria.

Tarea: ¿Qué es la Microbiología predictiva?
Y ¿Para qué sirve?

Antes de proceder al estudio de las diversas moléculas que pueden afectar el crecimiento o la viabilidad de los microorganismos, veamos unas cuantas definiciones básicas.

Agentes esterilizantes: son aquellos que producen la inactivación total de todas las formas de vida microbiana (o sea, su “muerte” o pérdida irreversible de su viabilidad). (También existen agentes físicos esterilizantes).

Agentes desinfectantes (o germicidas): son agentes (sobre todo químicos) antimicrobianos capaces de matar los microorganismos patógenos (infecciosos) de un material. Pueden (y en muchos casos suelen) presentar efectos tóxicos sobre tejidos vivos, por lo que se suelen emplear sólo sobre materiales inertes.

Agentes antisépticos: son sustancias químicas antimicrobianas que se oponen a la sepsis o putrefacción de materiales vivos. Se trata de desinfectantes con baja actividad tóxica hacia los tejidos vivos donde se aplican.

Quimioterápicos: son compuestos químicos con actividad microbicida o microbiostática, con una toxicidad suficientemente baja como para permitir su administración a un organismo superior, en cuyos fluidos corporales y tejidos permanece estable un cierto tiempo a concentraciones tales que los hace eficaces como antimicrobianos dentro del organismo.

Antibióticos de la Madre Naturaleza

TU SALUD !!!



Allium sativum



Echinacea angustifolia



Origanum vulgare



Eucalyptus globulus



Mentha piperita



Allium cepa



Zingiber officinale



Citrus × limon



Setas



Thymus vulgaris



Camellia sinensis



Propoleo



Syzygium aromaticum



Prueba de Antibiogramas sobre un medio de cultivo (nótese los halos de inhibición).



Desinfectantes y Antisépticos (Formulario Modelo de la OMS 2004)

ESTERILIZAR

Proceso físico o químico

Destruye casi todos los m.o.

Libre de m.o. viables

Sí se pueden eliminar esporas

Nivel de limpieza «extremo»

Sobre objetos y materiales inanimados

Lleva más tiempo

Calor húmedo (ebullición, pasteurización, **autoclave** – temperatura 121-134°C, presión 20-32 libras/pulgada², tiempo 15-20 min.-).

Calor seco (directo, flameado, al **horno** – temperatura 170°C, tiempo 2 hrs.-).

DESINFECTANTES

Agente químico

Destruye o inhibe m.o.

No necesariamente matan todo

En fase vegetativa o no esporulada

Reducen nivel

No dañan la salud ni la calidad de los bienes perecederos.

Sobre objetos y materiales inanimados

Desinfectar la piel y otros tejidos

Hipoclorito sódico

Cloroxilenol G+

Glutaral G+ y G-,
tuberculosis; hongos
Candida albicans,
VIH, Hepatitis B.

Nivel de limpieza «adecuado»

ANTISÉPTICOS

Tipo de desinfectante

Destruye o inhibe m.o.

Superficies del cuerpo o tejidos expuestos

Piel intacta, membranas mucosas, quemaduras y heridas

Prevenir sepsis

no dañan la salud ni la calidad de los bienes perecederos.

Polividona yodada (virus, bacterias, protozoos, hongos, quistes y esporas)

Clorhexidina, bactericida y bacteriostática (G+ y G-), no sobre *Pseudomonas* y *Proteus*, inactiva en micobacterias.

Etanol, bactericida.

Efecto de la Temperatura

Constituye el **método más sencillo para esterilizar** materiales, siempre y cuando el material mismo sea resistente al daño por calor.

Una **temperatura de 100°C aniquila a todos los tipos de bacterias con excepción de las esporas** en un lapso de 2 a 3 min en cultivos de laboratorio.



Para **aniquilar esporas** se utiliza una temperatura de **121°C**, a **20 lbs** de presión, durante **15 min (autoclave)**.

Por lo general **se utiliza vapor** por dos razones:

- 1) las bacterias **mueren más rápidamente** con la humedad,
- 2) el **vapor** ofrece un **medio para distribuir el calor** a todos los sitios del recipiente donde se lleva a cabo la esterilización.



A nivel del mar, el vapor se debe mantener a una presión de 15 libras/pulgada² (psi) por arriba de la presión atmosférica para obtener una temperatura de 121°C.

A una mayor altura, la presión debe ser mayor de 15 psi para alcanzar 121°C.

Para que los materiales estériles permanezcan secos, existen **hornos eléctricos** en los que circula aire caliente; como el calor es menos eficaz en materiales secos, se acostumbra aplicar una temperatura de **160 a 170°C** durante **1 h o más**.

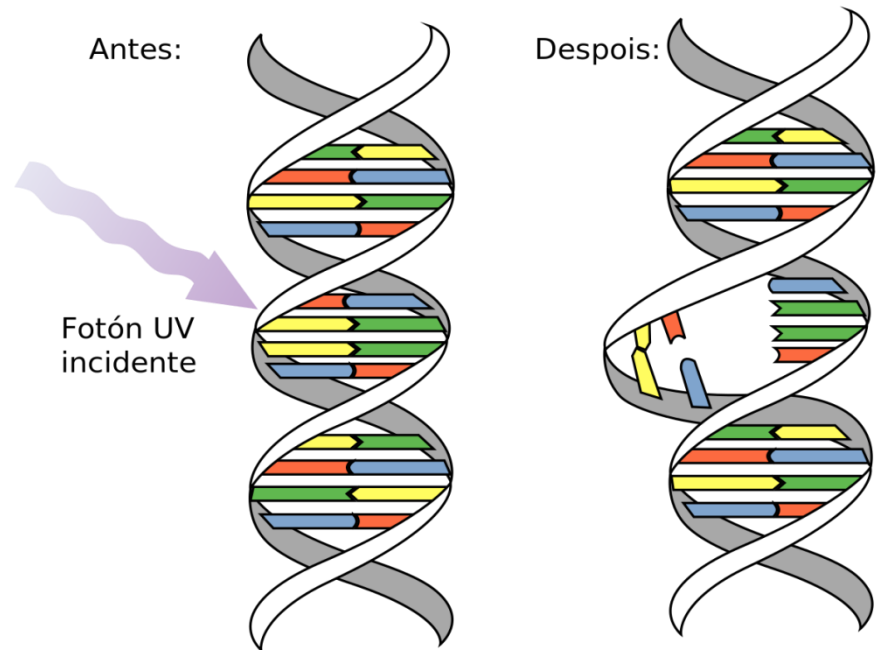


En las condiciones antes descritas (p. ej., temperatura excesiva aplicada por periodos prolongados), **el calor actúa desnaturalizando las proteínas celulares y los ácidos nucleicos y desorganizando las membranas celulares.**

Efecto de las radiaciones

La **luz ultravioleta** y las **radiaciones ionizantes** tienen diversas aplicaciones como esterilizadores. Las radiaciones lesionan al DNA de diversas formas:

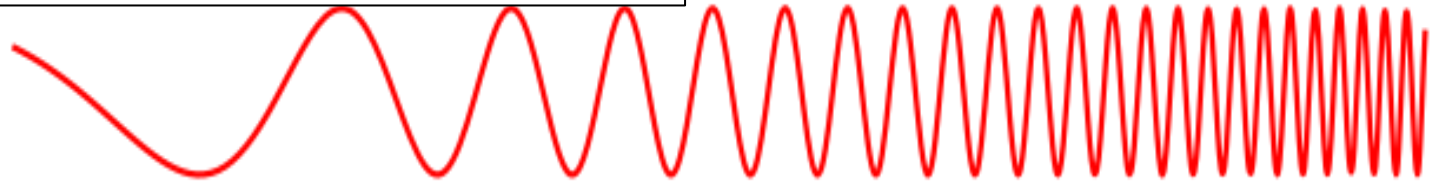
La **luz ultravioleta (UV)**, por ejemplo, induce enlaces cruzados entre pirimidinas adyacentes en alguna de las dos tiras de polinucleótidos, formando dímeros de pirimidina.



Las lesiones del DNA por radiaciones o sustancias químicas aniquilan a la célula principalmente al interferir con la multiplicación del DNA.

- ENERGÍA (No ionizante)

+ ENERGÍA (Ionizante)



Tipo de radiación
Longitud de onda (m)

Radio

10^3



Edificios

Microondas

10^{-2}



Humanos

Infrarrojo

10^{-5}



Mariposas



Punta de
aguja

Visible

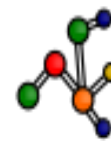
$0,5 \times 10^6$



Protozoos

Ultravioleta

10^{-8}



Moléculas

Rayos X

10^{-10}



Átomos

Rayos gamma

10^{-12}



Núcleo atómico

Frecuencia (Hz)



10^4

10^8

10^{12}

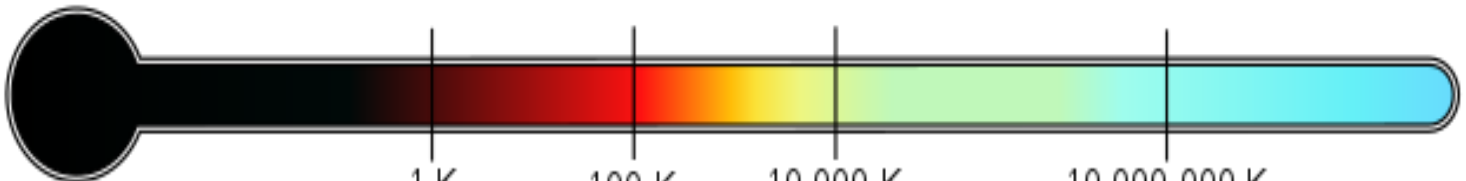
10^{15}

10^{16}

10^{18}

10^{20}

Temperatura de los
objetos en los cuales
la radiación con esta
longitud de onda es
la más intensa



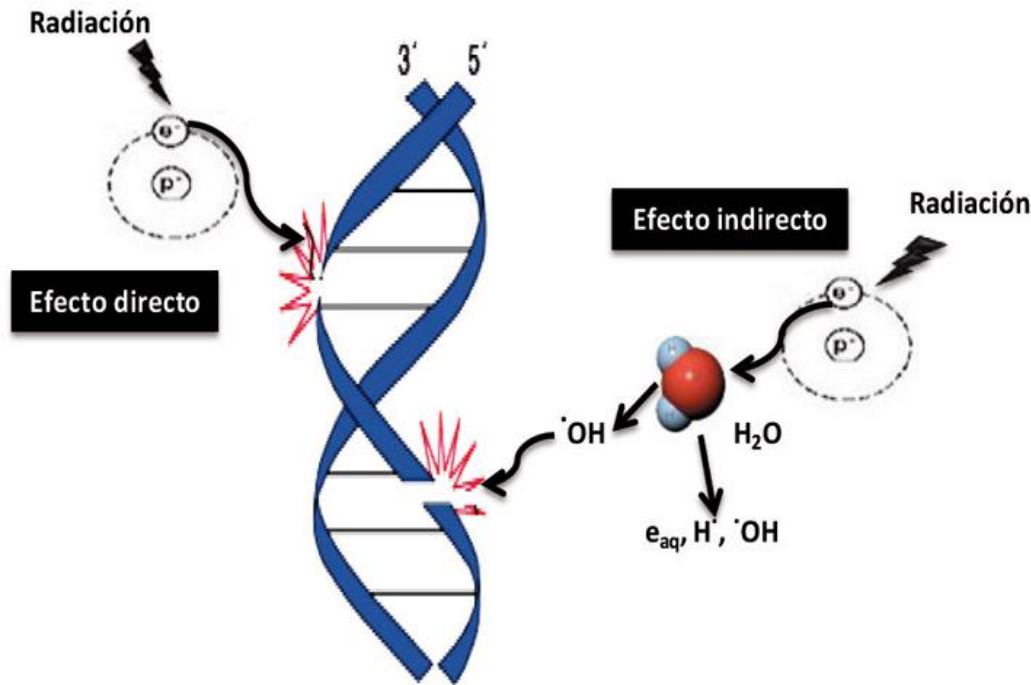
1 K
-272 °C

100 K
-173 °C

10.000 K
9.727 °C

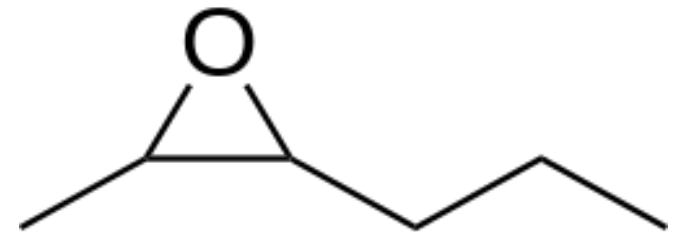
10.000.000 K
~10.000.000 °C

Las **radiaciones ionizantes** rompen las tiras únicas y dobles. Puede ajustarse su dosis para producir efectos pasteurizantes o esterilizantes.



Efecto **LETAL DIRECTO**: se dan a altas dosis de reacción. Ocasionan daños en el ADN rompiendo o entrecruzando ambas cadenas.

Efecto **LETAL INDIRECTO**: deriva de la hidrólisis del agua. Expuesta al Oxígeno forma peróxidos (Ej. H₂O₂) y epóxidos (bacteriostáticos y bactericidas, esterilización en frío).



Éteres cíclicos (2,3-epoxihexano).

Fragmento de DNA

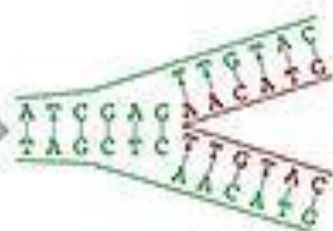
Duplicación de DNA

DNA en las células hijas 1ª generación

DNA en las células hijas 2ª generación

La proteína codificada es normal

ATCGAGTTGTAC
TAGCTCAACATG



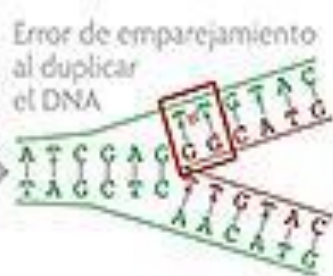
ATCGAGTTGTAC
TAGCTCAACATG

ATCGAGTTGTAC
TAGCTCAACATG

UV

T_oT Dímero timina

ATCGAGTTGTAC
TAGCTCAACATG



ATCGAGTTGTAC
TAGCTCGGCATG

ATCGAGTTGTAC
TAGCTCAACATG

ATCGAGTTGTAC
TAGCTCGGCATG

Mutación que será transmitida a las células hijas

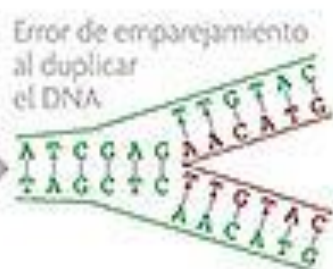
ATCGAGTTGTAC
TAGCTCGGCATG

La proteína codificada puede no ser funcional

Rayos X o γ

G^o Guanina oxidada

ATCGAGTTGTAC
TAGCTCAACATG



Mutación que será transmitida a las células hijas

ATCGAGTTGTAC
TAGCTCAA AATG

ATCGAGTTGTAC
TAGCTCAACATG

ATCGAGTTGTAC
TAGCTCGGAATG

Mutación que será transmitida a las células hijas

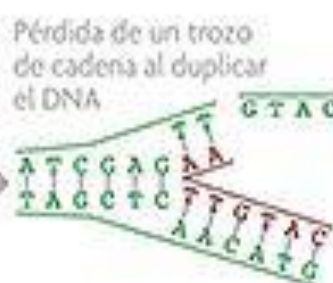
ATCGAGTTGTAC
TAGCTCAA AATG

La proteína codificada puede no ser funcional

Rayos X o γ

Corte en la cadena de DNA

ATCGAGTTGTAC
TAGCTCAACATG



Mutación que será transmitida a las células hijas

ATCGAGTTT
TAGCTCAA Pérdida de un trozo de DNA

ATCGAGTTGTAC
TAGCTCAACATG

ATCGAGTTT
TAGCTCAA Pérdida de un trozo de DNA

La proteína codificada puede no ser funcional

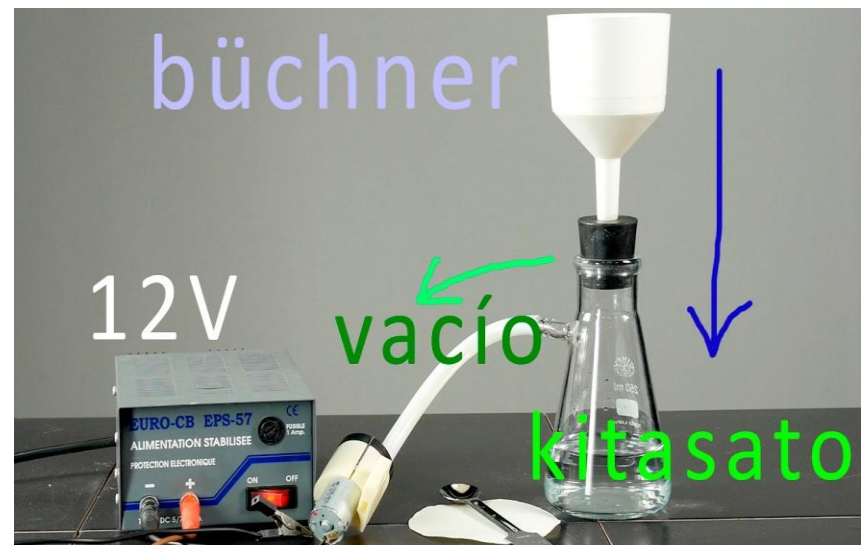
Filtración

Un **filtro** es un dispositivo que se encarga de retener partículas de dimensiones predeterminadas y/o microorganismos.

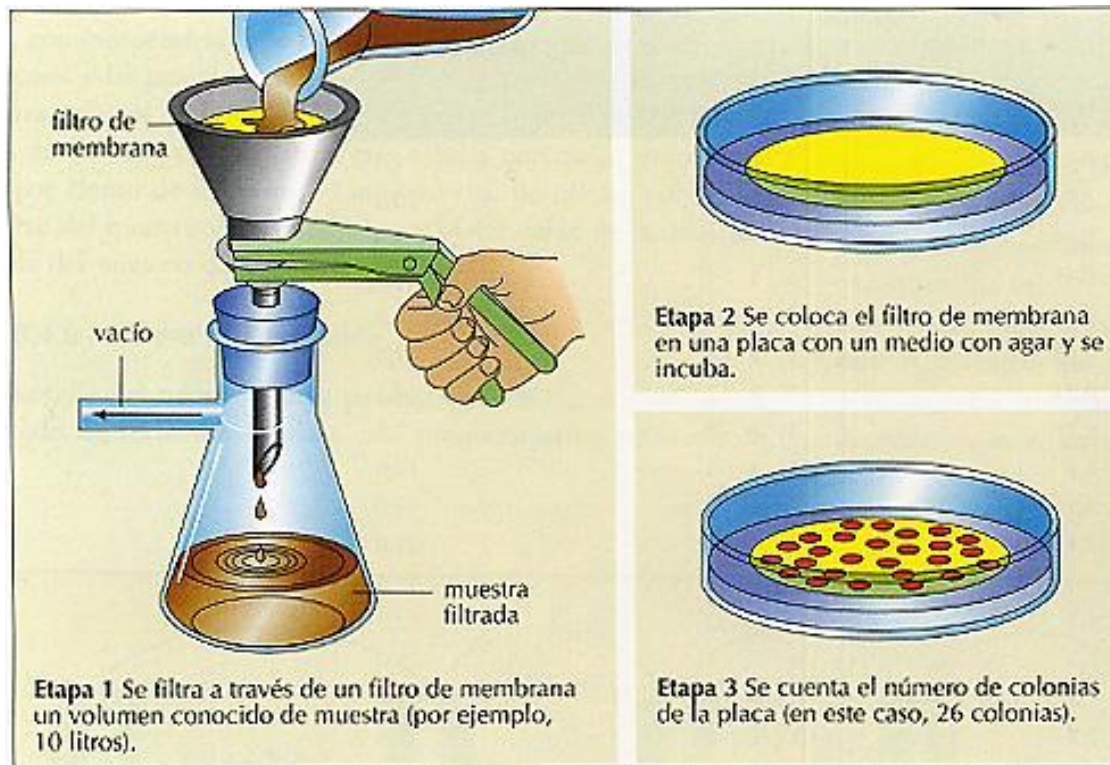
La **filtración** es un procedimiento físico de esterilización de fluidos donde el líquido o el gas pasa a través de un cedazo con poros lo suficientemente pequeños como para retener a los microorganismos.

Actualmente se conocen tres formas de filtración:

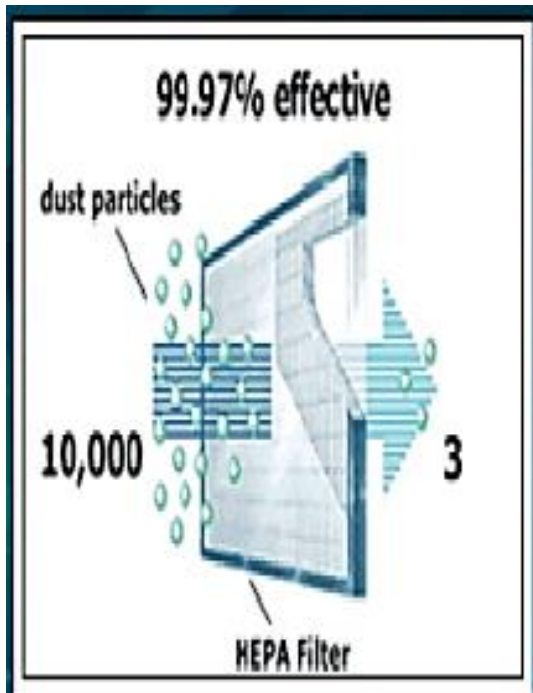
Filtración clásica: se emplean discos de amianto, de asbesto o de acetato de celulosa con porosidad uniforme que se colocan en porta filtros Seitz. Se crea un vacío en el frasco receptor Kitasato que ayuda a aspirar el líquido a través del filtro. Ejemplo: para la purificación de agua potable.



Filtración de membrana: estos filtros tienen solo 0.1 mm de espesor. Después del filtrado los filtros pueden colocarse en un medio de cultivo para realizar a posteriori el recuento de las colonias crecidas y llevar a cabo la identificación para establecer la efectividad del filtro.



Filtración aérea: es útil para «eliminar» bacterias y hongos del aire (con filtros de aire para partículas de alta eficiencia [**HEPA, High Efficiency Particulate Air**]) o de diversas soluciones.



Los filtros HEPA están diseñados específicamente para proteger el sistema respiratorio del ser humano. Es un filtro de alta eficiencia en el control de partículas suspendidas ($D_p < 1\mu\text{m}$). También se le conoce como «**filtros Absolutos**».

Sin embargo, estos filtros no pueden eliminar los virus, micoplasmas y algunas bacterias pequeñas (debido a su *Diámetro de partícula* muy pequeños).

El **material filtrante** debe de ser **inerte** para no reaccionar con los componentes de la solución, **presentar resistencia mecánica** y tener un **tamaño de poro menor que los microorganismos** que deben ser retenidos.

Tradicionalmente se usan filtros de **nitrocelulosa desechables** con tamaño de poro de 0,45 o de 0,22 micras.

La esterilización por filtración **se emplea para materiales sensibles al calor**, tales como ciertos medios de cultivo, azúcares, soluciones de antibióticos y otros medicamentos, etc.

Virología

Rama de la **Microbiología** que se encarga del **estudio de los Virus**, características, estructura, genética, replicación y formas de control.



Virus (= Veneno), patógenos descritos en 1892 por IWANOVSKI. Investigó una enfermedad que afectaba el **tabaco**, a la que se refirió como “***contagium vivum fluidum***”.

Los virus se caracterizan por:

1. Tienen **un solo tipo de ácido nucleico**, o bien DNA o bien RNA.
2. Para la **reproducción** únicamente es **necesario el ácido nucleico**.
3. No son capaces de reproducirse fuera de células vivas (**parásitos obligados**).

4. El desarrollo conduce a la **muerte de la célula hospedadora**.
5. Esta compuesto por el **ácido nucleico y una cubierta proteica (la cápside)**.
6. La partícula vírica es un **nucleocápsido**.
7. **Clasificación actual:** basada en las características bioquímicas, **estructura y modo de replicación**.

Enemigo mortal

ESTRUCTURA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

Glicoproteínas

Permiten la unión a las células humanas

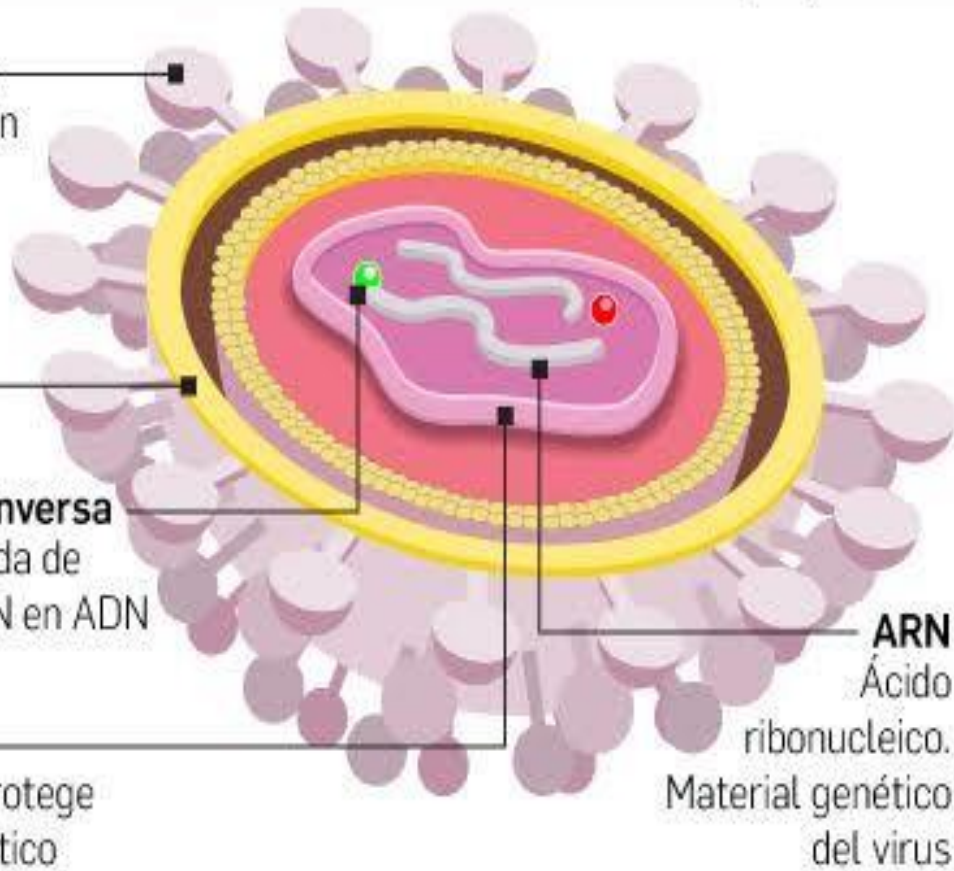
Membrana lipídica

Transcriptasa inversa

Enzima encargada de transformar ARN en ADN

Cápside

Envoltura que protege el material genético



ARN

Ácido

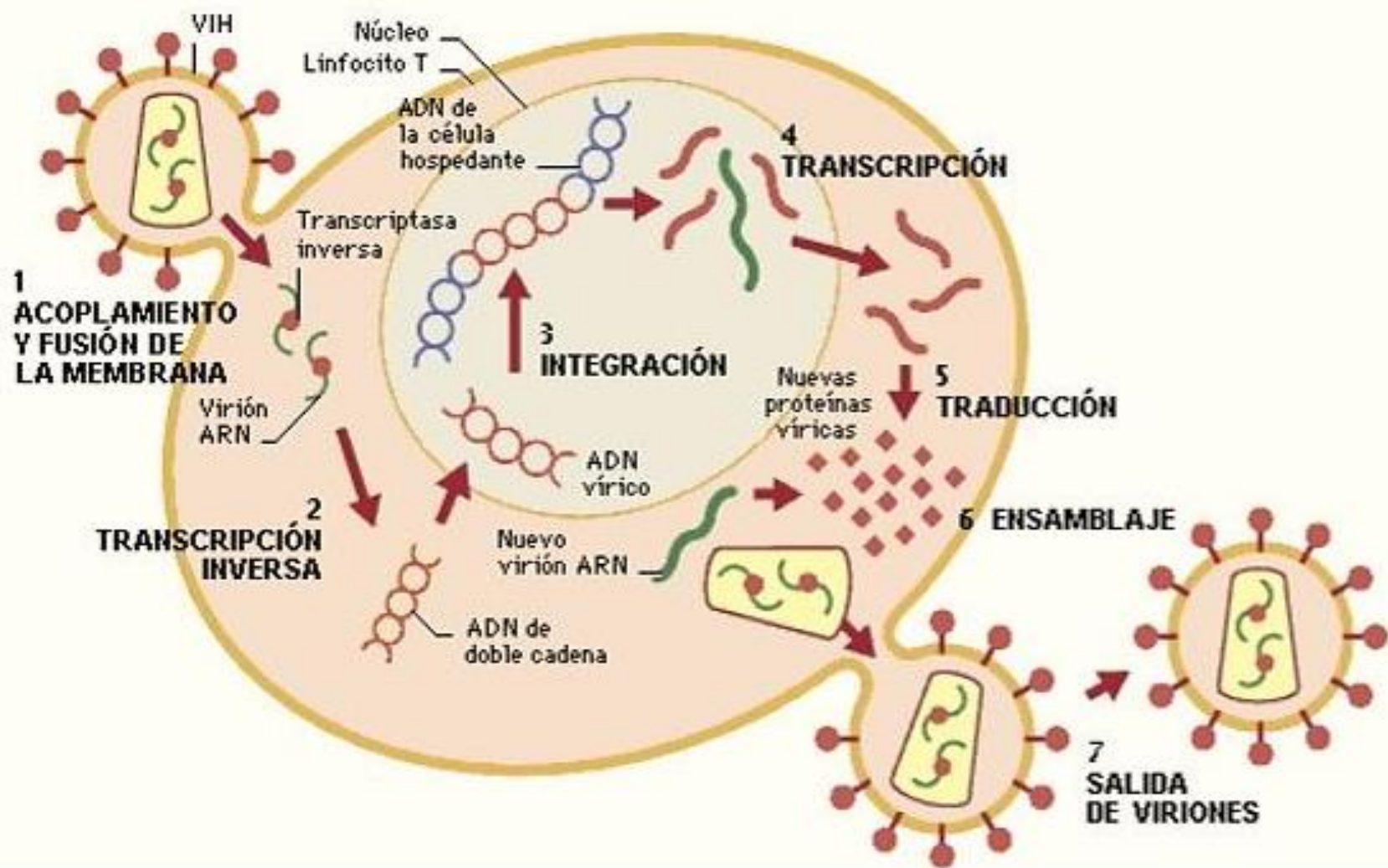
ribonucleico.

Material genético

del virus

EL VIH infecta a las células del sistema inmunitario, alterando o anulando su funcionamiento. La infección produce un deterioro progresivo del sistema inmunitario. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es un término que se aplica a los estadios más avanzados de la infección por VIH.

Ciclo viral del VIH



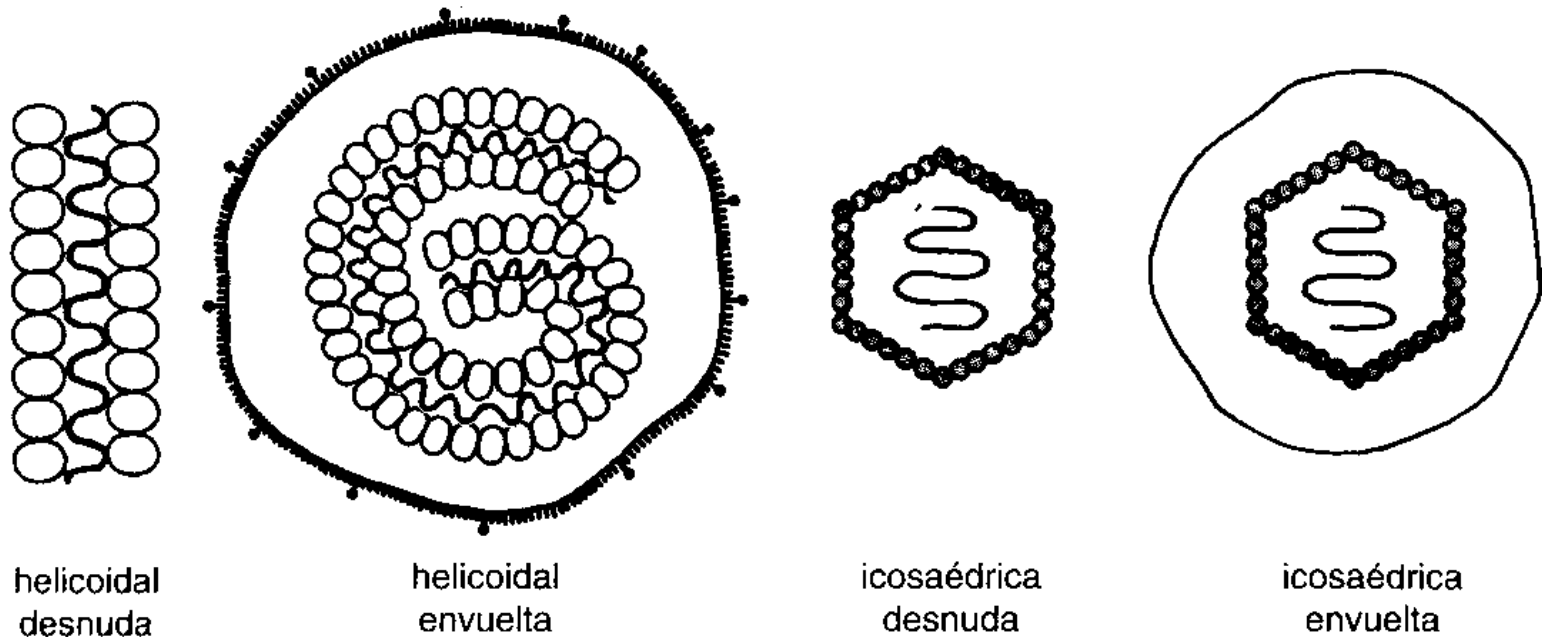


Fig. 4.3 Tipos estructurales de las partículas víricas. Se representan cuatro constituciones: dos con simetría helicoidal y dos con cúbica, dentro de cada tipo uno desnudo y otro recubierto por una envuelta.

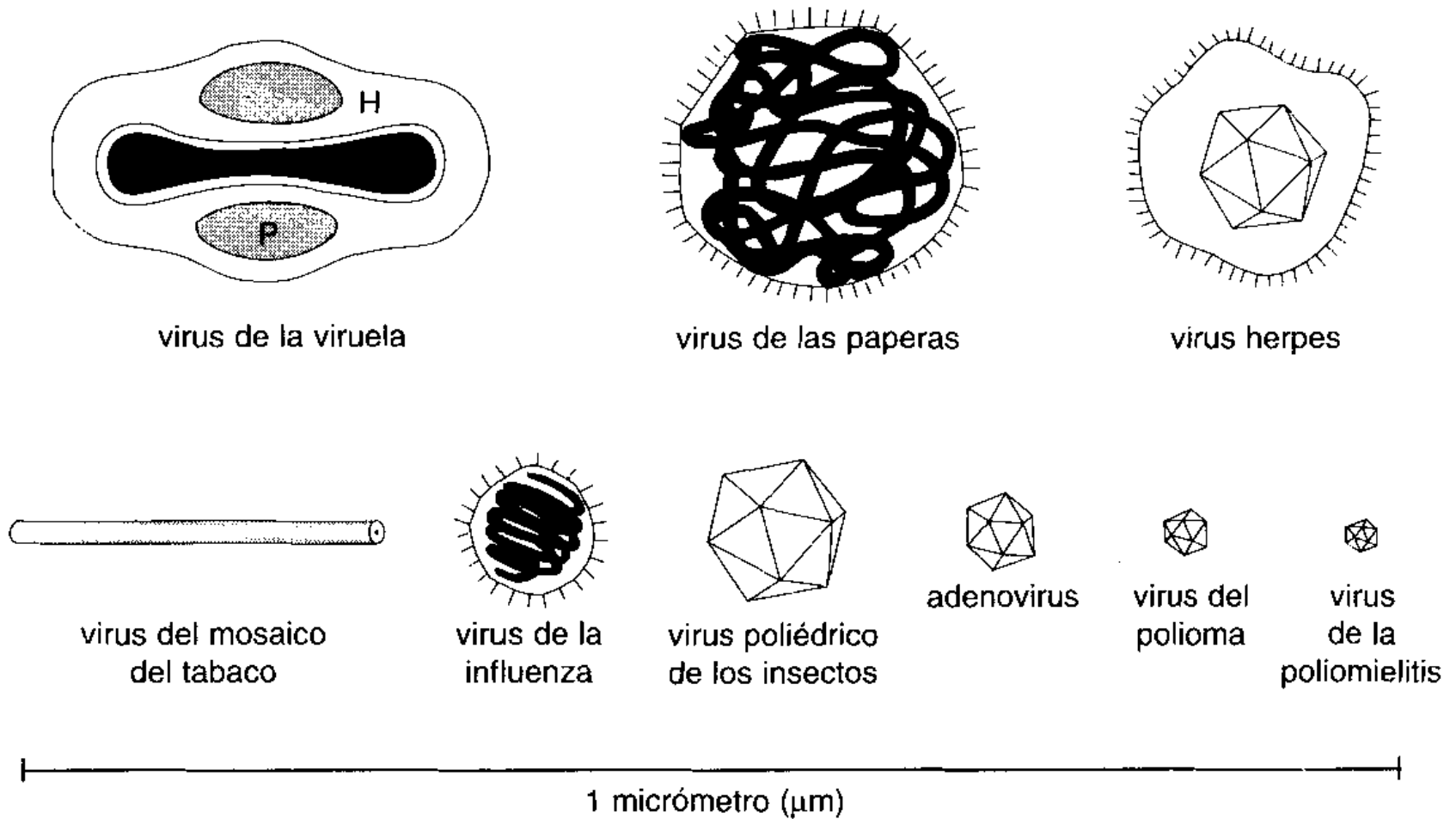


Fig. 4.2 Forma y tamaño de algunas partículas víricas. Abreviaturas: DNA = DNA vírico, P = partícula proteica elíptica, H = envoltura.

Mecanismos de Inhibición del crecimiento y destrucción

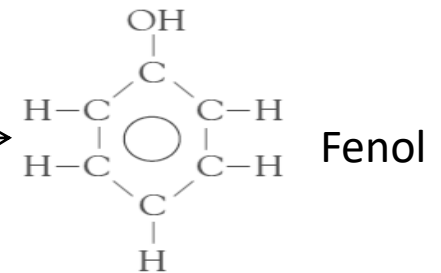
Mediante una serie de **sustancias químicas** puede hacerse **mas lento el crecimiento** de los microorganismos **o impedirse totalmente**.

Si el **crecimiento se detiene** y se **reinicia** una vez eliminada= **bacteriostático** (acción bacteriostática).

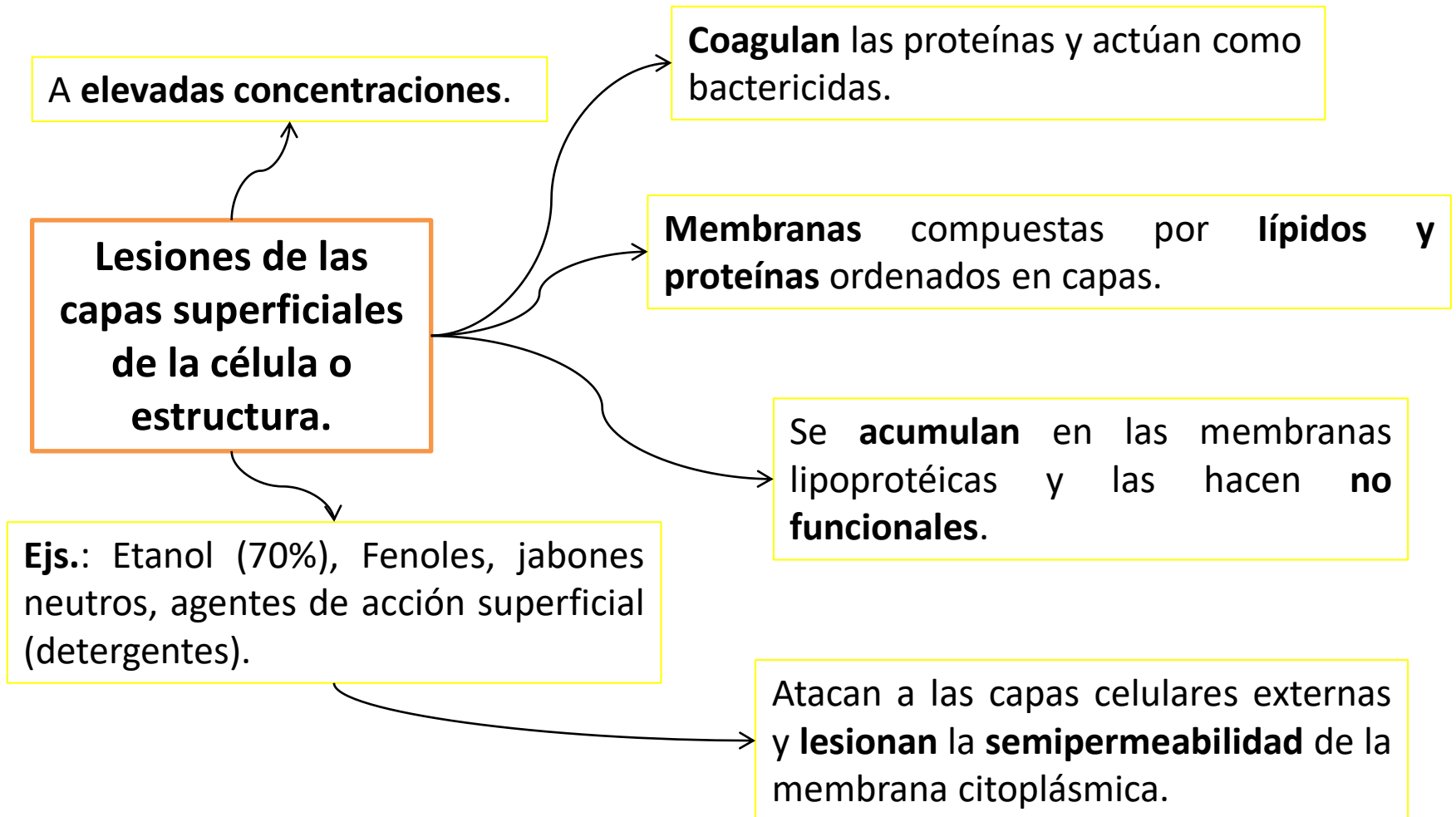
Los agentes **bactericidas** conducen a la **destrucción** de las células.

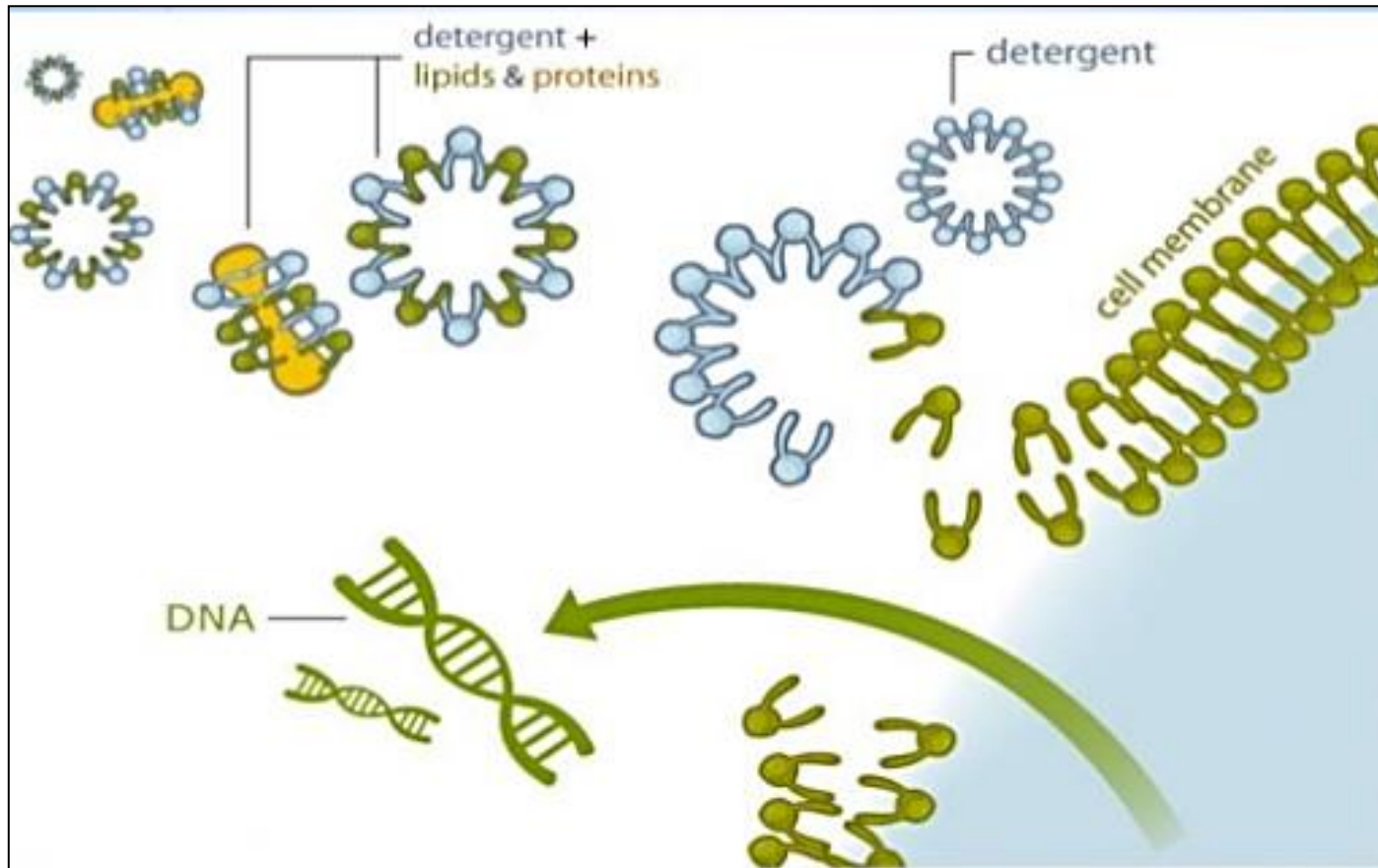
Ambas dependen de la concentración.

Algunas bacterias pueden **tolerar o incluso utilizar** como fuente energética, **venenos generales** de las células y del metabolismo.



Para un gran número de **agentes antimicrobianos** se conoce en cierta medida el **punto de acción** en la célula, así como el **mecanismo de actuación**.





Efecto de los detergentes sobre las membranas celulares.

Algunos metales pesados actúan como venenos de enzimas a pequeñas concentraciones (Cu, Ag, Hg, entre otros).

El **cianuro** es un **veneno** de la respiración y **bloquea** por unión del **Fe** la función de la enzima terminal de la respiración, la *citocromo-oxidasa*.

Lesiones de enzimas y metabolismo básico.

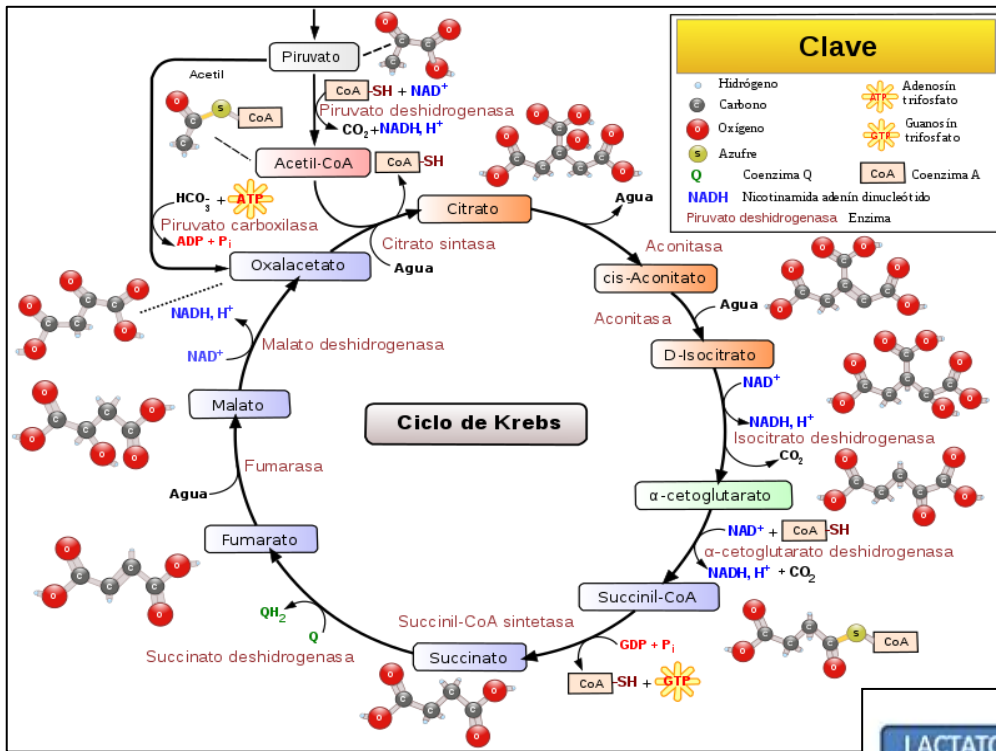
Tanto en forma de **sales** (HgCl_2 , CuCl , NO_3Ag)...

O en forma de compuestos **orgánicos** (4-hidroxiomercuriobenzoato).

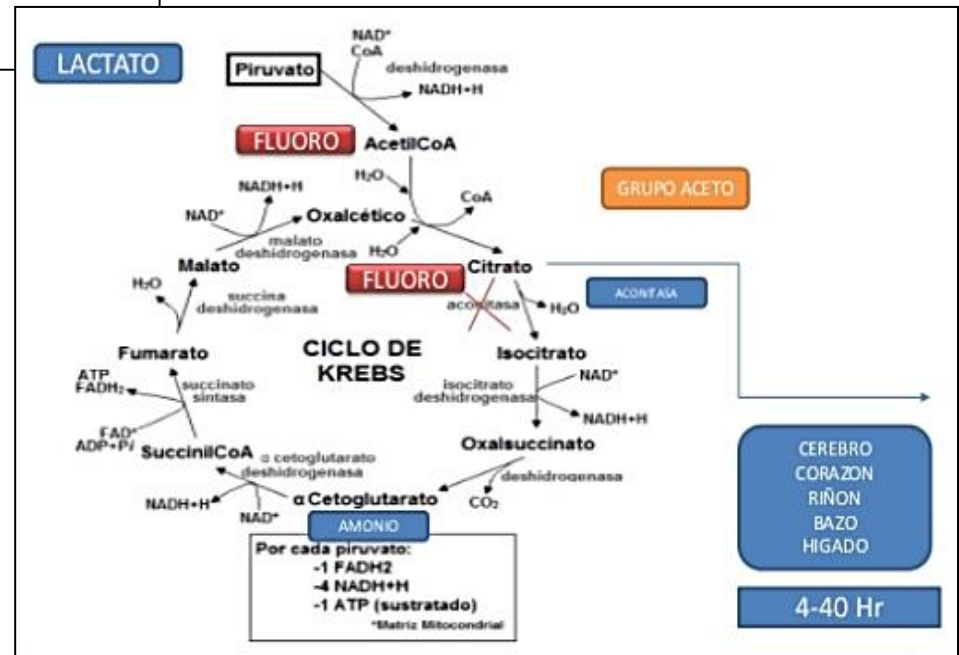
Modifican profundamente la **estructura** terciaria y cuaternaria de las proteínas.

El **CO** **inhibe** la respiración por competencia con el oxígeno libre a nivel de la *citocromo-oxidasa*, actúa por tanto por "**inhibición competitiva**".

El **fluoracetato bloquea** el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (se une a Acetil CoA= **Fluorocitrato**= bloquea Aconitasa= **síntesis letal**)= ↑amonio y ↑ácido láctico.



«**Síntesis letal**» causada por Fluoracetato de Sodio en el Ciclo de Krebs.

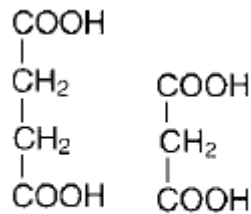


Se basan en la **semejanza** estructural del **inhibidor** y de la **sustancia normal**.

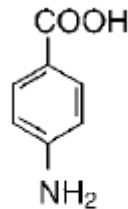
La **asimilación** de un **antimetabolito** en la célula se puede manifestar sobre todo de distintos modos en la biosíntesis.

Inhibición competitiva.

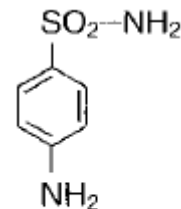
Ejemplo: **Inhibición de la transformación del succinato a fumarato a través del malonato.**



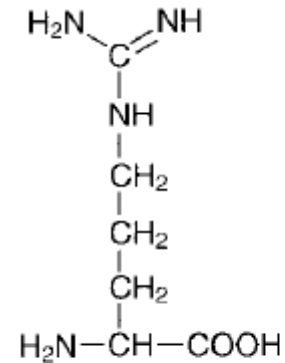
succinato malonato



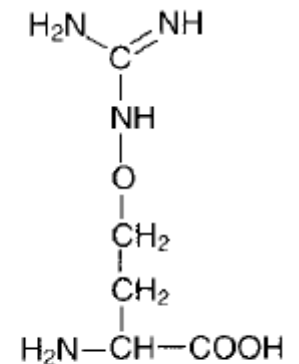
4-amino-
benzoato



sulfanilamida



arginina



canavanina

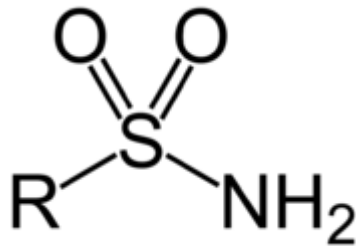
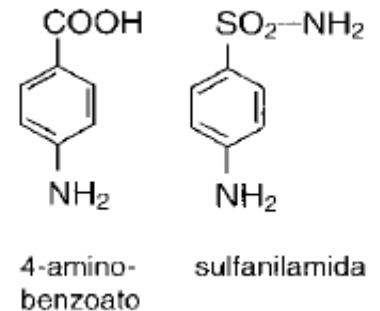
La base de la **inhibición** es un **mecanismo competitivo**.

Los **análogos estructurales** pueden impedir la incorporación del metabolito normal y así evitar la síntesis de componentes celulares.

Impedimento en la síntesis de componentes celulares.

También **incorporarse a polímeros** y tener como consecuencia la **disminución o pérdida** de la **actividad** de un **enzima** o de un **ácido nucleico**.

Ejemplo: La acción antibacteriana de las **sulfonamidas** (su **semejanza** estructural con el **4-amino-benzoato**, clave para comprender el mecanismo de acción)= Toxicidad selectiva.



Sulfanilamida en medios de cultivo= **Síntesis** de un **coenzima no funcional**, y así en último término a la **detención del crecimiento**.

El punto de **intervención** es la **función del ribosoma 70S.**

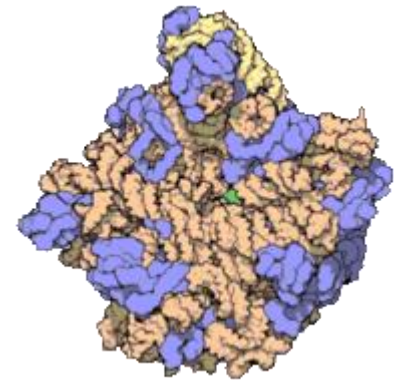
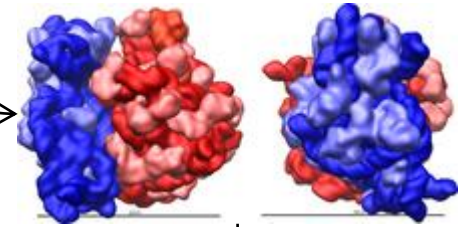
Inhibición de la síntesis proteica por antibióticos.

Estreptomicina y Neomicina: impiden el proceso de unión de los aminoácidos.

Eritromicina: influye en la función de la subunidad 50S.

Tetraciclinas: inhiben el anclaje del aminoacil-RNA_t a los ribosomas.

El **Cloranfenicol** impide la incorporación de aminoácidos a proteínas, aparentemente inhibiendo el enlace de los aminoácidos mediante la peptidil-transferasa.



Estructura atómica de la subunidad mayor del ribosoma procarionte 70S (En azul las proteínas ribosomales, en naranja y amarillo dos moléculas de ARN ribosomal. El centro verde representa el sitio activo).

La **síntesis de ácidos nucleicos** se ve inhibida por varios antibióticos.

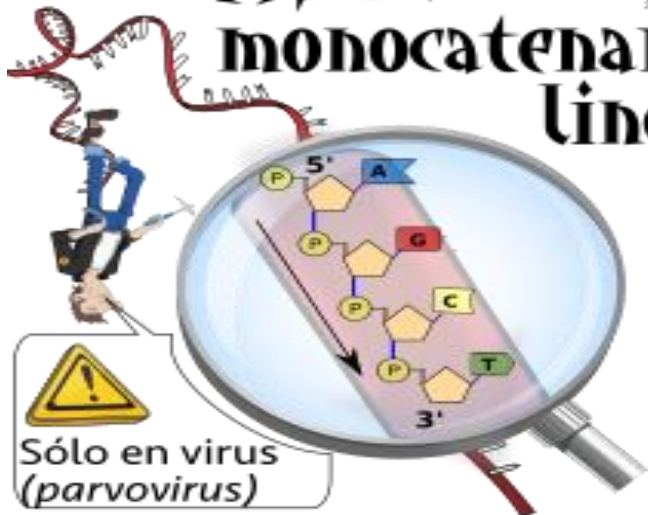
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos por antibióticos.

Rifampicina: actúa sobre la *RNA-polimerasa* DNA dependiente e impide así la síntesis de RNA_m en bacterias.

Actinomicina D: forma complejos con el DNA de doble cadena fijándose a la Guanina; impide la síntesis de los tres tipos de RNA's, pero no la replicación del DNA.

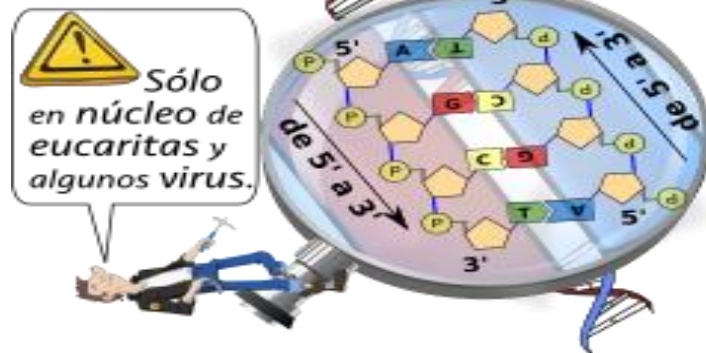
Mitomicina C: impide selectivamente la síntesis de DNA, sin influir en principio en la síntesis de RNA y de proteínas. La acción se debe a **roturas en las cadenas** y a una **unión y formación de puentes** en el **DNA de doble cadena**.

ADN monocatenario lineal



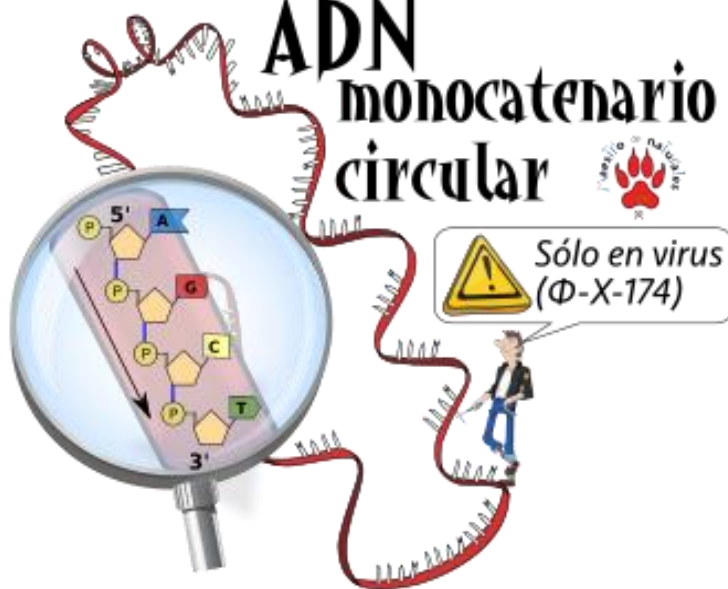
Sólo en virus (parvovirus)

ADN bicatenario lineal



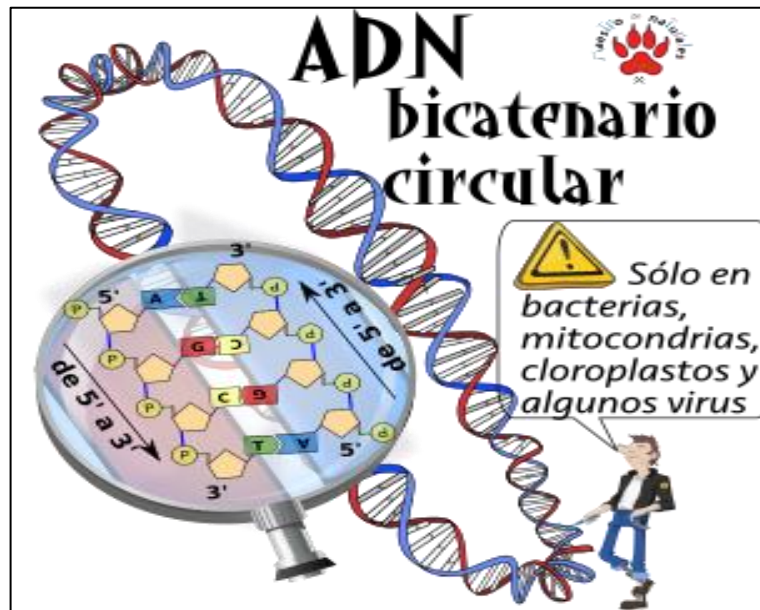
Sólo en núcleo de eucaritas y algunos virus.

ADN monocatenario circular



Sólo en virus (Φ -X-174)

ADN bicatenario circular



Sólo en bacterias, mitocondrias, cloroplastos y algunos virus

Otros agentes actúan a nivel de pared celular **inhibiendo** la **síntesis** del **glucopéptido** (**mureína**).

Inhibición de la síntesis de la pared celular.

Ejemplos: la Penicilina y Cefalosporinas.

Sobre **células en crecimiento** en un medio de **cultivo hipotónico** estas células **estallan**.

En un medio de **cultivo isotónico o hipertónico**, los bacilos se transforman en **esferas**, que se denominan **formas L** o "**esferoplastos**".

La muerte y destrucción de microorganismos.

Pérdida irreversible de la capacidad de crecer y multiplicarse, o capacidad de formar colonias.

Muchas **lesiones celulares** que conducen a la muerte celular son **reparables** y pueden superarse **bajo determinadas condiciones.**

Son bien conocidas las reactivaciones después del efecto de las radiaciones UV o del calor.

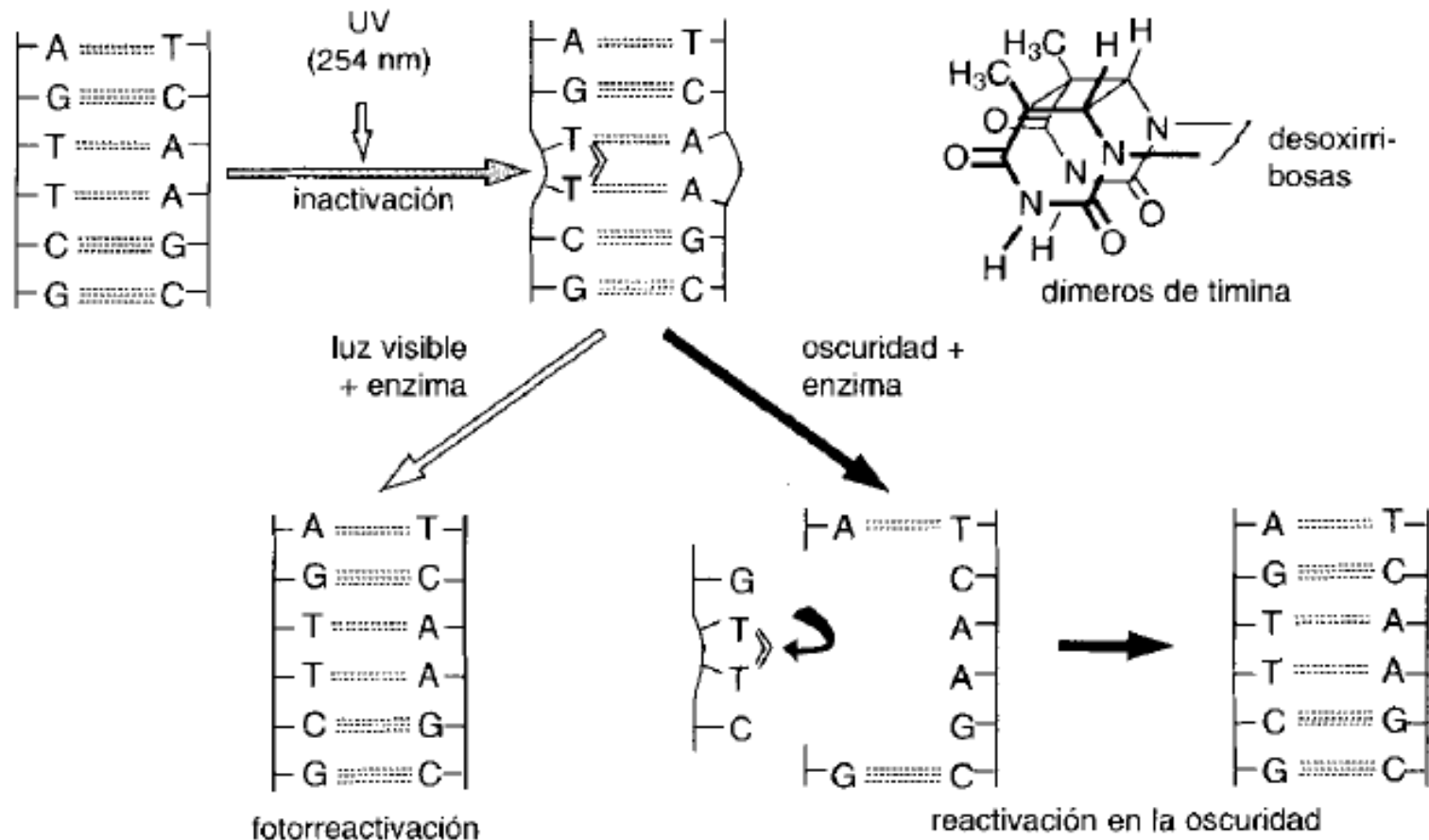


Fig. 15.4 Representación esquemática de la alteración provocada en el DNA por irradiación con ultravioleta y de los procesos de la fotorreactivación y de la reactivación en la oscuridad. Véase texto y apartado 15.1.6.