Práctica 11. Electrotransformación

Transferencia de material genético

Objetivo

* Aplicar la técnica de Kirby Bauer para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.
* Intepretar los resultados de la prueba de sensibilidad empleando los estándares internacionales.
* Determinar el efecto de los agentes químicos sobre el crecimiento microbiano.

Introducción

El uso de antibióticos y otros compuestos químicos para el control de microorganismos es una práctica común en las distintas actividades humanas, por lo que es necesario poder establecer en cada caso cual es agente químico y las condiciones de su aplicación para obtener los mejores resultados cuidando de no sobreexponer el ambiente a una contaminación.

1ª parte

*Obtención de células competentes*

Materiales

* Microorganismos

*E. coli* w3110 en 4 mL de caldo YENB. Precultivo de 37°C/18h/300 r.p.m.

* Equipo y materiales

2 mecheros

1 gradilla

1 vaso de pp de 250mL

1 pinzas de punta roma

Turbidímetro

Hisopos estériles

* Material que deben tener los alumnos

1 caja petri de vidrio con 30 discos de papel filtro grueso de 7mm de diámetro estériles

* Reactivos por equipo (sugerencias)

Solución de Cristal Violeta 1% en solución acuosa.

Solución de Verde de Malaquita 1% en solución acuosa.

Solución de antibiótico.

Etanol 96%.

Isopropanol 70%.

Benzal.

Yodo 1% (isodine).

Solución de hipoclorito 5%.

Triclosan (enjuague bucal).

Solución de vinagre de caña 1%.

Solución de manzanilla (gotas oftálmicas).

Alimento probiótico (yogurt natural o yacult).

CuSO4 1%.

Antibióticos por microorganismo

* Medios de cultivo por equipo

4 cajas Petri con Agar Mueller Hinton

2 tubos de 13x100 con 3mL de SSI estéril

Metodología

* Preparación del inóculo e inoculación de las cajas petri

1. Seleccionar por equipo una de las bacterias (cepa ATCC y cepa aislada).
2. Realizar una suspensión de cada una de las bacterias en solución salina isotónica o amortiguadora y ajustar a una turbidez semejante a la del tubo 0.5 de la curva de McFarland. Emplear el densímetro.
3. Con ayuda de un hisopo realizar una inoculación masiva a partir de la cepa ATCC una de las cajas de agar Mueller Hinton.
4. Con ayuda de un segundo hisopo inocular de forma masiva la cepa aislada en las otras tres caja con agar Mueller Hinton.

* Efecto de los antibióticos

|  |  |
| --- | --- |
|  | 1. Seleccionar los antibióticos para la cepas inoculadas. 2. Utilizar la caja inoculada con la cepa ATCC y una más con la cepa aislada. 3. Con las pinzas estilizadas con alcohol colocar los antibióticos en ambas cajas como se muestra en el esquema. 4. Incubar las cajas a 37ºC durante 24 horas y revisar. |

* Efecto de los agentes químicos

1. Colocar unas gotas de los agentes químicos en vasos desechables.
2. Utilizar dos cajas inoculadas con la cepa aislada.
3. Impregnar los discos de papel en las soluciones y dejar escurrir junto al mechero. Tener cuidado con las soluciones alcohólicas.
4. Depositar 5 discos de papel previamente impregnados con diferentes soluciones sobre la superficie del agar de cada una de las cajas de inoculadas. Distribuir el resto de los discos.
5. Incubar las cajas de bacterias durante 24 horas a 37ºC.
6. Al término de la incubación marcar con un marcador indeleble la zona de inhibición e incubar a temperatura ambiente durante otro periodo de 48 horas y posteriormente refrigerar.

2ª sesión

*Resultados del efecto de los agentes químicos*

Materiales

* Por equipo

Regla y marcador

Metodología

* Efecto de los antibióticos

1. Con ayuda de una regla o un vernier medir el diámetro del halo para cada uno de los antibióticos.
2. Interpretar los resultados en las tablas del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) en Breakpoint tables for bacteria <http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/> o las del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).
3. Completar los resultados del grupo en la siguiente tabla.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Bacterias | Antimicrobiano y concentración | Diámetro Cepa ATCC | Diámetro Cepa aislada | Interpretación |
| *Escherichia coli* |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| *Pseudomonas aeruginosa* |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| *Staphylococcus aureus* |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| *Enterococcus faecalis* |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |

* Efecto de los agentes químicas

1. Con ayuda de una regla o un vernier medir el diámetro del halo para cada uno de los agentes químicos
2. Verter los resultados en la siguiente tabla.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | Diámetro | | | |
| Producto y principio activo | Mecanismo de acción | *Escherichia coli* | *Pseudomonas aeruginosa* | *Enterococcus faecalis* | *Staphylococcus aureus* |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

Disposición de desechos

1. El material plástico como las cajas de Petri desechables, papel filtro y palillos de madera deberán colocarse en los contenedores de incineración previamente atadas con masking las cajas de Petri.
2. Esterilizar en autoclave el material de vidrio y posteriormente lavar.

Bibliografía complementaria

* Cappuccino, J. & Sherman, N., Microbiology: A laboratory manual, California. Benjamin Cummings, 2010.
* Leboffe Michael J. and Burton E. Pierce. 2006. Microbiology laboratory theory and application. 2nd edition, Morton Publishing Co. USA.
* Madigan M.T, Martinko J.M., Stahl D and Clark D.P., Brock Biology of microorganisms, 13th edition, UK, Pearson Benjamin Cummings, 2010.
* Prescott L.M., Harley J.P. and Klein G.A., Microbiología, 3a edición, Madrid, México, Mc GrawHill-Interamericana, 2009.
* Tortora G.J., Funke B.R. and Case C.L., Microbiology: An Introduction with Mastering Microbiology, 11th edition, UK, Pearson Benjamin Cummings, 2012.

Cuestionario

1. Menciona 3 microorganismos productores de antibióticos, mencionando el antibiótico que producen y el mecanismo de acción de cada uno.
2. ¿Qué es la resistencia a antibióticos? ¿Cómo se transmite?
3. ¿Cuáles son los fundamentos y el uso de las técnicas de difusión en placa y dilución?
4. ¿Qué es la concentración mínima inhibitoria?

Glosario de medios de cultivo

Investiga la formulación y preparación del medio de Mueller Hinton.

Glosario de microorganismos

* *Enterococcus faecalis*