

Flora normal de la garganta

Objetivos

1. Aprender sobre la flora microbiana asociada a la garganta y posibles patógenos de la garganta.
2. Aislar bacterias asociadas a la garganta.
3. Repasar sobre pruebas usadas para la identificación de especies de *Streptococcus*.

I. Flora normal de la garganta

La garganta es clasificada como parte de tracto respiratorio superior, al igual que la nariz, cavidades sinusales y nasofaringe. La levadura *Candida* se puede encontrar en menor proporción como parte de la flora oral y puede ocasionar candidiasis oral por su aumento de crecimiento en la zona. Este sobre crecimiento de la población puede ser causado porque el paciente esta inmunodeficiente, tomando terapias para el cáncer o antibióticos de amplio espectro, es un bebe prematuro. Algunas de las bacterias parte de la microflora del tracto respiratorio superior son especies de *Neisseria* no patogénicas, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Haemophilus* sp. Aunque sean parte de la flora del lugar en algunos casos pueden ocasionar infecciones como es *S. pyogenes* que está asociada a la piel y a la garganta. Por eso al momento de diagnosticar una infección en esta área se lleva cabo pruebas que distinguan entre especies patogénicas de las no patogénicas que forman parte de la microbiota del lugar. Se usa protocolo y medios selectivos y diferenciales para agilizar la identificación del causante de la infección.

La toma de muestra del tracto respiratorio superior depende de la parte a evaluar. Por ejemplo, para tomar muestra clínica de la garganta se debe evitar tocar zonas de la lengua y boca con hisopo estéril. Usando depresor se pasa el hisopo estéril por el área detrás de la úvula por la tonsila (amígdalas), faringe posterior y zonas inflamadas o con úlceras. Se recomienda que la toma de muestra con el hisopo sea con movimiento rotatorios para tomar más muestra del lugar. Muchas veces estas muestras son inoculadas en agar de sangre para identificar posibles estreptococos que ocasionan infección. La faringitis puede ser ocasionada por *S. pyogenes* o por *N. gonorrhoeae*. Otras bacterias como *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae* pueden ocasionar infecciones en diferentes áreas del tracto respiratorio superior.

El género *Streptococcus* tiene especies relacionadas a la microbiota del humano como asociados a enfermedades en humano. Se usa características morfológicas, pruebas serológicas, pruebas bioquímicas y reacciones en medios selectivos y diferenciales para su clasificación. Se clasifican en grupos A, B, C, D, F y G por las pruebas serológicas. Y en grupo alfa, beta, Gamma por su reacción hemolítica en el medio de agar de sangre. Es un género con importancia médica porque entre sus especies hay causantes de faringitis, impétigo, fiebre reumática, meningitis, abscesos, endocarditis, infecciones urinarias, caries, neumonía entre otras enfermedades. Por ejemplo, *S. pyogenes* es el más frecuente causante de faringitis y tonsilitis.

Patrón hemolítico de los estreptococos en agar de sangre

Tipo de hemolisis	Observación
Alfa (α)	Color verdoso o descoloración amarillada alrededor de la colonia que indica lisis parcial
Beta (β)	Zonas claras o incoloras alrededor de la colonia que indican lisis completa
Gamma (γ)	El medio queda igual alrededor de las colonias indicando que no hubo lisis.

Tabla tomada del libro: Clinical and pathogenic microbiology, B.J. Howard.

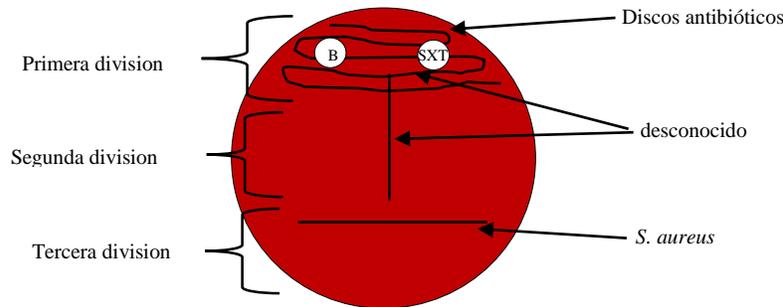
Práctica:

A. Aislar bacterias de la garganta

1. Limpie el área de trabajo con desinfectante y lleve a cabo las técnicas asépticas aprendidas en microbiología general.
2. Rotule el anverso del plato Petri de agar de sangre con iniciales, fecha, Biol 4375L sección. Divida el plato en 4 zonas para poder inocular a través de un estriado de 4 cuadrantes.
3. Usando el depresor de lengua presione la lengua del estudiante para evitar contacto con la misma. Introduzca el hisopo humedecido con amortiguador hacia la parte de atrás de la garganta. Tome la muestra rotando a la vez el hisopo. Evite tocar la lengua, cachetes, dientes.
4. Inocule la muestra en una porción del 1 cuadrante haciendo zig-zag y rotando el hisopo a la vez.
5. Luego esparza el restante de la muestra desde el primer cuadrante a los demás usando una aguja de inocular y llevando a cabo la técnica de estriado en 4 cuadrantes.
6. Coloque parafina al plato e incuba a 37°C por 24-48 horas hasta que vea crecimiento bacteriano para aislar.
7. Anote las observaciones de apariencia de las colonias, cambio de color del medio y tome fotos del plato. Verifique si hay hemólisis en el medio usando la tabla sobre el patrón hemolítico de los estreptococos.
8. Luego, seleccione una colonia, favorablemente que produzca hemólisis, y aísle en un tubo inclinado de “Tryptic Soy Agar” (TSA). Guarde el plato de agar de sangre en la nevera e incubar el tubo a 37°C por 24-48 horas. Guarde el tubo de TSA en la nevera luego de observar bastante crecimiento del desconocido.

B. Pruebas para identificar el desconocido de la piel que se realizará en el próximo laboratorio.

1. **Tinción Gram:** ya discutida y practicada en el primer laboratorio. Seguir las instrucciones de esa separata.
2. **Reacción CAMP:** Es una prueba usada para identificar el grupo B de estreptococos porque este grupo produce un péptido (CAMP) que actúa en presencia de la beta hemólisis que produce *S. aureus* y se observa como un aumento en el efecto hemolítico. La prueba se hace en agar de sangre y se inocula el *S. aureus* horizontal a la inoculación recta del desconocido. Si es positivo la prueba entonces se observa una hemólisis como en forma de flecha.
 - a. Rotule el anverso del plato Petri de agar de sangre con iniciales, fecha, Biol 4375L sección. Divida el plato de agar de sangre en tres zonas o franjas.
 - b. Inocule haciendo zig-zag su desconocido en la primera división del plato. En esta área se hará la prueba de susceptibilidad a bacitracina y a SXT que se explicara más adelante.
 - c. Inocule nuevamente su desconocido en una línea recta y de forma perpendicular en la parte central de la segunda división.
 - d. En la tercera división del plato, inocule a *S. aureus* de forma horizontal haciendo una línea recta.



3. **Sensibilidad a Bacitracina y a Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT):** Se busca ver si la bacteria es susceptible al antibiótico bacitracina o a SXT. Se coloca discos impregnados una concentración específica del antibiótico. Si la bacteria forma un halo de inhibición que es una zona sin crecimiento bacteriano alrededor del disco, entonces es susceptible al antibiótico. Es recomendable que se corrobore con la información de manufacturero del antibiótico sobre el rango del diámetro del halo para ver si es realmente susceptible. Para BBL Sensi-disc antimicrobial susceptibility tests, la bacteria es resistente bacitracina si tiene un halo menor o igual a 8mm, susceptibilidad intermedia si es 9-10 mm y susceptible si es mayor o igual a 13mm. La bacteria *S. aureus* ATCC 25923 tiene un halo de 12-22mm con este antibiótico de esta compañía. Las bacterias del grupo A de estreptococos son sensibles a la bacitracina. La bacteria es resistente SXT si tiene un halo menor o igual a 10mm, susceptibilidad intermedia si es 11-15 mm para unas bacterias y de 16-18 para otras. Es susceptible a SXT si es mayor o igual a 16mm o 19mm. El grupo A y grupo B de estreptococos son resistentes a SXT.
 - a. Coloque el disco de bacitracina en uno extremo de la primera división, usando unas pinzas previamente esterilizadas con alcohol y flameadas en el mechero. Luego de usar las pinzas debe esterilizarlas pasando por alcohol y flameando con fuego.
 - b. Luego coloque el disco de SXT en el otro extremo de la primera división, usando unas pinzas previamente esterilizadas con alcohol y flameadas en el mechero. Luego de usar las pinzas debe esterilizarlas pasando por alcohol y flameando con fuego.
 - c. Coloque parafina al plato e incube a 37°C (no invertir el plato) por 24 horas.
 - d. Anote las observaciones en la libreta y mida el diámetro del halo de inhibición en milímetros (mm). Tome foto.
2. **Prueba de esculina biliar:** Ayuda a identificar el grupo D de estreptococos que son los enterococos. Estos hidrolizan la esculina en presencia de sales biliares rompiendo la esculina en glucosa y esculetina. El medio cambia a un color oscuro por las sales de hierro que se producen por la interacción de esculetina y el hierro, haciendo un resultado positivo para la prueba. La prueba es negativa si no ocurre el cambio de color a oscuro por completo en 24-48horas.
 - a. Rotule el tubo del medio de esculina biliar usando un pedazo de cinta adhesiva y coloque iniciales, fecha, Biol 4375L sección.
 - b. Usando las técnicas asépticas, inocule el desconocido en el tubo de agar inclinado haciendo zig-zag en la superficie inclinada.
 - c. Incube a 37°C por 24-48 horas.

- d. Anote las observaciones en la libreta a las 24 y 48 horas sobre cambio de color y tome foto.
3. **Catalasa:** Enzima que degrada H₂O₂ (peróxido) en agua y oxígeno. El peróxido puede ser tóxico para las células incluyendo a las bacterias. Ayuda a diferenciar bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*.
 - a. Al finalizar de realizar las transferencias de su desconocido a las diferentes pruebas, añada unas gotas de peróxido 3% al tubo del desconocido.
 - b. Observar si crea burbujas que es indicativo de un resultado positivo a la prueba.
 - c. Anotar resultado en la tabla de su libreta y tome foto.

Algunas pruebas para identificar grupos de estreptococos

Grupo	Hemólisis	CAMP	Bacitracina	SXT	Catalasa	Esculina biliar	Desconocido
A	B	-	Sensible	Resistente	-	-	
B	B	+	Resistente	Resistente	-	-	
C	B	-	Resistente	Sensible	-	-	
D	α, β, γ	-	Resistente	Resistente	-	+	
viridans	α, γ	-	Resistente	Sensible	-	-	

Tabla tomada del manual: Laboratory exercises in microbiology, 4^{ta} ed., Harley & Prescott.

Referencias

Carroll, K.C. (2013). The streptococci, enterococci and related genera. In: *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology* (26^{ta} ed., pp. 209-227). McGraw-Hill. Recuperado de: http://microbiology.sbm.ac.ir/uploads/jawetz_2013__medical_miceobiology.pdf.

Harley, J.P. & Prescott, L.M. (1999). *Laboratory exercises in microbiology* (4^{ta} ed.). Dubuque, IA: WCB/McGraw-Hill.

Howard, B.J. & Ducate, M.J. (1987). Streptococci. In: B.J. Howard (Ed.), *Clinical and pathogenic microbiology* (pp. 245-263). St. Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company.

Norell, S.A. (1985). *Laboratory text in introductory microbiology for health sciences students*. Englewoods cliffs, NJ: Prentice-Hall, Inc.

Rubin, S.J. (1987). Specimen collection and processing. In: B.J. Howard (Ed.), *Clinical and pathogenic microbiology* (pp. 207-230). St. Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company.

Vandepitter, J., Verhaegen, J., Enbaek, K., Rohner, P., Piot, P. & Heuck C.C (2003). *Basic laboratory precedures in clinical bacteriology* (2da ed.). World Health Organization Geneva. Recuperado de: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/42696>.