

Flora normal de la piel y la susceptibilidad a caries

Objetivos

1. Aprender sobre la flora microbiana asociada a la piel y a la boca.
2. Observar de forma cualitativa la susceptibilidad a caries.
3. Aislar bacterias asociadas a la piel.

I. Flora normal

Cuando se habla de la **microbiota normal** en los humanos se refieren a los microorganismos asociados a las mucosas y órganos de una persona saludable. La microbiota ayuda en la defensa del cuerpo contra patógeno y enfermedades. Estos microorganismos tienen un rol importante en la digestión, metabolismo de la comida y en la degradación de toxinas. La flora normal ayuda a mantenernos saludables y en función normal a nuestro cuerpo. Esta microbiota puede ser clasificada en: 1) **microbiota residente**, la cual regularmente se encuentra en un área del cuerpo y que puede reestablecerse después de algún cambio o disturbio, y 2) **microbiota transitoria** que son los microorganismos que se encuentran en esa área del cuerpo por un tiempo pero no se establecen en el lugar. Se puede clasificar los patógenos bajo esta última categoría. Si no hay una microbiota residente establecida, entonces la microbiota transitoria puede proliferar y afectar. Los microorganismos aislados de diferentes partes del cuerpo son una porción de toda la microbiota que se encuentra en nuestro cuerpo. La microbiota asociada a nuestro cuerpo está afectada por factores como la edad, la dieta, el estado hormonal, salud, condiciones sanitarias y de higiene de la persona. Adicional, depende de factores como la humedad, la temperatura, los nutrientes entre otros. La microbiota de nuestro cuerpo va cambiando a través de nuestras vidas. Ciertas circunstancias pueden ocasionar que la propia flora normal cause enfermedad. Por ejemplo, bacterias asociadas a la garganta sean reubicadas en el área de los pulmones a través de un procedimiento en el hospital ocasionando una neumonía. Microorganismos que son parte de nuestra microbiota puede convertirse en patógenos cuando la limitación que ocasiona que se mantengan en su área habitual es eliminada.

Algunos ejemplos de microbiota que coloniza nuestro cuerpo

Piel	Tracto respiratorio	Tracto gastrointestinal	Tracto genitourinario
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Neisseria</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.
<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>Candida</i> spp.		<i>Prevotella</i> spp.	<i>Candida</i> spp.
<i>Bacillus</i> spp.		<i>Bifidobacterium</i> spp.	

II. Flora bucal

La cavidad bucal se compone de las membranas mucosas, lengua, dientes y glándulas salivares. Las glándulas salivares secretan saliva que contienen anticuerpos y lisozimas que pueden matar las bacterias que afectan a la cavidad bucal. Aunque se ha encontrado que no todas las salivas pueden ser igual de efectivas en la protección de la cavidad bucal. Los microorganismos que entran a la cavidad bucal pueden ocasionar placa dental que es una biopelícula, y caries. Las **placas dentales** contienen microorganismos y materia orgánica en la superficie de los dientes. Bacterias del género *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*,

Fusobacterium pueden encontrarse en las placas dentales. Las **caries** ocurren porque se desintegra el esmalte y la superficie del diente por el ácido producido por las bacterias asociadas a la placa dental como es la bacteria *S. mutans* y *Lactobacillus* sp. Se produce ácidos como es el ácido láctico a través de la fermentación de azúcares en la cavidad bucal bajando el pH, aumentando la degradación del esmalte dental y a su vez promoviendo las caries. También, la producción de placa dental promueve más ambientes anaerobios idóneos para la fermentación de azúcares. Hay pruebas llevadas a cabo con medios de cultivo para observar si los microorganismos asociados a la cavidad bucal promueven fermentación. La que realizaremos en el laboratorio la prueba con el agar Snyder.

El medio **Snyder test agar** es usado para ver la susceptibilidad a caries. Esta prueba se realiza para ver si hay producción de ácidos por el crecimiento y fermentación de glucosa por microorganismos acidogénicos encontrados en la cavidad bucal. Un ejemplo de estos microorganismos es la bacteria *Lactobacillus*. Este medio contiene dextrosa que es un azúcar simple usada por bacterias fermentadoras y bromocresol verde que es un indicador de cambios en pH. El bromocresol verde le imparte el color verde al medio y cambia a amarillo cuando baja el pH a 4.4. Se inocula 0.2ml de saliva en el medio y se incuba a 37°C. Se va observar si ocurre un cambio de color se podría indicar que hay fermentación de azúcares por los microorganismos encontrados en la muestra de saliva. Si este cambio de color entre las 24 a 72 horas de incubación se sugiere susceptibilidad a formación de caries por la persona. Más rápido ocurre el cambio de color, sugiere más bacterias fermentadoras presentes en la muestra de saliva.

Practica: Observar cualitativamente la susceptibilidad a las caries
Los tubos de Snyder test agar estarán colocados en el baño de María a 45°C para derretirlos.

1. Limpie el área de trabajo con desinfectante y lleve a cabo las técnicas asépticas aprendidas en microbiología general.
2. Rotule el tubo del medio “Snyder test agar” usando un pedazo de cinta adhesiva y coloque iniciales, fecha, Biol 4375L sección.
3. Tome una muestra de saliva en la bolsa estéril. Luego inocule 0.2ml de la muestra de saliva en el tubo con medio derretido usando una pipeta Pasteur.
4. Ruede entre sus manos el tubo del medio para mezclar la saliva con el medio derretido.
5. Coloque los tubos en hielo para enfriar.
6. Incuba el tubo a 37°C por 72 horas. Anote observaciones de cambio de color en el tubo a las 24, 48 y 72 horas. Luego coloque el tubo en la gradilla designada para descartar que se encuentra en el cuarto de las incubadoras pero antes remueva la cinta adhesiva del mismo.

Tiempo incubación	Observación	Susceptibilidad
24hrs.	amarillo	Positivo-alta
48hrs.	amarillo	Positivo-moderado
72hrs	amarillo	Positivo-baja

Tabla creada en combinación con información de los manuales: Microbiology: A laboratory manual, 4th ed. Cappuccino & Sherman, y Laboratory test in introductory microbiology for health sciences students. Norell, S.A (1985)

Ejemplo de tabla a realizar en la libreta para la colecta de datos. La misma debe ser usada para la redacción de resultados y la discusión de los mismos en la libreta.

Tiempo incubación	Observación	Susceptibilidad (si o no)
24hrs.		
48hrs.		
72hrs		

III. Flora de la piel

La piel es uno de los órganos del cuerpo que es una defensa a la entrada de patógenos. Sus características de ser compuesta de capas donde la más externa tiene células muertas y queratina que son barreras, proveyendo un ambiente no óptimo para el crecimiento de microorganismos. Además, este órgano produce sustancias que fomenta el ambiente inhóspito como son los aceites producidos por las glándulas sebáceas, el sudor por las glándulas sudoríparas. Estas sustancias pueden aportar nutrientes a la microbiota normal de la piel que están adaptadas al lugar y bajar el pH evitando el crecimiento de microbiota no residentes. En la piel se puede encontrar microbiota transitoria por ser un órgano en continuo contacto con el ambiente y microbiota residente. Ejemplo de estas son *Corynebacterium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Peptostreptococcus* spp. y *Actinobacter* sp.

Práctica:

A. Aislar bacterias de la piel

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 “Mannitol Salt Agar” (MSA) con iniciales, fecha, Biol 4375L sección. Divida el plato en 4 zonas para poder inocular a través de un estriado de 4 cuadrantes.
3. Frote un área del cuerpo con un hisopo estéril humedecido con amortiguador (“buffer de fosfato”).
4. Inocule en el primer cuadrante con el hisopo, 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.
5. Coloque parafina al plato e incuba a 37°C por 24-48 horas hasta que vea crecimiento bacteriano para aislar.
6. Anote las observaciones de apariencia de las colonias, cambio de color del medio y tome fotos del plato. Luego, seleccione una colonia y aísle en un tubo inclinado de “Tryptic Soy Agar” (TSA). Guarde el plato de MSA en la nevera e incubar 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. **Mannitol Salt Agar:** Es un medio selectivo, ya que tiene componentes que inhibe el crecimiento de un grupo de bacterias y deferencial por tener compuestos que permite ver diferencia entre bacterias relacionadas. El componente que lo hace selectivo es el

- 7.5% de NaCl que inhibe el crecimiento de algunas bacterias. La azúcar manitol es el compuesto que promueve diferencial entre especies de *Staphylococcus* ya que algunas pueden fermentar manitol y otras no. El indicador de cambio de pH por la fermentación de manitol es el rojo fenol que imparte un color rojo fusha al medio y cambia a amarillo al bajar el pH.
- a. Por el anverso del plato Petri MSA, divida en 4 áreas el plato para que 4 parejas de estudiantes inoculen su desconocido. Así que será 1 plato Petri MSA por mesa. En cada área designada para una pareja debe estar rotulada con las iniciales de la misma. El plato debe estar rotula con Biol 4375L y sección.
 - b. Inocule su desconocido en una porción del plato haciendo una línea recta. Selle el plato con parafina.
 - c. Incube el plato invertido a 37°C por 24-48 horas y anote observaciones de cambio de color y crecimiento de la bacteria en el medio en su libreta. Tome foto.
3. **Coagulasa:** es una enzima que coagula el plasma de la sangre. *Staphylococcus aureus* tiende hacer positivo para esta prueba. Al inocular un poco de la bacteria en unas gotas de plasma, se mezcla y se observa si hay aglutinación del plasma (coagulo), lo cual indica un resultado positivo. En algunos casos hay que incubar por un periodo de tiempo para observar la aglutinación.
- a. Rotule el tubo con iniciales, fecha, Biol 4375L sección.
 - b. Inocular el desconocido en el tubo de ensayo que contiene plasma de conejo y mezclar bien.
 - c. Incubar por al menos 3 horas a 37°C. Mejor sería hasta 4 horas.
 - d. Observar si se coagula el plasma del tubo indicando positivo a la prueba. Anotar los resultados en la libreta y tome foto.
4. **Sensibilidad a Novobiocina:** Se busca ver si la bacteria es susceptible al antibiótico novobiocina como lo es *S. aureus* y *S. epidermidis*. Se inocule la bacteria en el medio Mueller-Hilton o Antibiotic Medium y 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 tets, la bacteria es resistente si tiene un halo menor o igual a 17mm, susceptibilidad intermedia si es 18-21 mm y susceptible si es mayor o igual a 22mm.La bacteria *S. aureus* ATCC 25923 tiene un halo de 22-31mm con este antibiótico de esta compañía.
- a. Por el anverso del plato Petri Antibiotic medium, divida en 3 áreas el plato para que 3 parejas de estudiantes inoculen su desconocido. En cada área designada para una pareja debe estar rotulada con las iniciales de la misma. El plato debe estar rotula con Biol 4375L y sección.
 - b. Inocule el desconocido usando un hisopo estéril en el área designada.
 - c. Coloque el disco de antibiótico centralizado en su área, 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.
 - d. Coloque parafina al plato e incube a 37°C (no invertir el plato) por 24 horas.

- e. Anote las observaciones en la libreta y mida el diámetro del halo de inhibición en milímetros (mm). Tome foto.
5. **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 diferenciar las especies de *Staphylococcus*

Prueba	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	Desconocido
Crecimiento en MSA	+	+	+	
Fermentación MSA	+	-	-	
Pigmentación colonia	Amarillo dorado	blanca	Blanca	
Coagulasa	+	-	-	
Hemolisis	Beta	-	-	
Sensibilidad a novobiocina	Sensitiva (suceptible)	Sensitiva (suceptible)	Resistente	
Catalasa	+	+	+	

Tabla tomada del manual Microbiology: A laboratory manual, 4^{ta} ed. Cappuccino & Sherman.

Referencias

Black, J.G. (2012). Oral and gastrointestinal diseases. In: *Microbiology: Principles and explorations* (8^{va} ed., pp. 680-721). NJ: John Wiley & Sons, Inc.

Black, J.G. (2012). Diseases of the skin and eyes; wounds and bites. In: *Microbiology: Principles and explorations* (8^{va} ed., pp. 574-605). 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.

Carroll, K.C. (2013). Normal human microbiota. In: *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology* (26^{ta} ed., pp. 165-174). McGraw-Hill. Recuperado de: http://microbiology.sbm.ac.ir/uploads/jawetz_2013__medical_miceobiology.pdf.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S. & Pfaller, M.A. (1998). Microbial flora in health and disease. In: M. Brown (Ed.), *Medical microbiology* (3^{era} ed., pp. 70-73). St. Louis, Missouri: Mosby, Inc.

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