

Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología

Luis Esaú López-Jácome,* Melissa Hernández-Durán,* Claudia Adriana Colín-Castro,* Silvestre Ortega-Peña,* Guillermo Cerón-González,* Rafael Franco-Cendejas*

* Laboratorio de Infectología, Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados (CENIAQ), Instituto Nacional de Rehabilitación.

Dirección para correspondencia:
Rafael Franco Cendejas,
Calz. México-Xochimilco Núm. 289
Col. Arenal de Guadalupe, 14389
Del. Tlalpan, Ciudad de México, DF
Tel: +52 (55) 59991000, ext. 14801
E-mail: rafranco@inr.gob.mx

Recibido: 3 de junio de 2013.
Aceptado: 4 de octubre de 2013.

Este artículo puede ser consultado
en versión completa en:
<http://www.medigraphic.com/rid>

Palabras clave: Tinción, microorganismo, microbiología, colorante de Gram, Wright, Ziehl-Neelsen, azul de lactofenol.

Key words: Laboratory stains, microorganism, microbiology, Gram, Wright, Ziehl-Neelsen, lactophenol blue.

Resumen

Las tinciones en microbiología son las primeras herramientas que se utilizan en el laboratorio para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Desde hace más de un siglo han ayudado a resolver problemas de etiología microbiana. Hay una gran variedad de tinciones, que se han ido desarrollando para la detección de los diferentes agentes infecciosos –en los que se incluyen bacterias, parásitos y hongos–. La tinción de Gram se considera básica en la valoración inicial de muestras para análisis bacteriológico, mientras que la tinción de Wright se ocupa para el diagnóstico de enfermedades muy particulares en el rubro de la parasitología. Hay técnicas tintoriales específicas de gran utilidad, como la tinción de Ziehl-Neelsen, que se utiliza para el diagnóstico de enfermedades crónicas como la tuberculosis o la actinomycosis, o la tinción de azul de lactofenol, que preserva e identifica a los componentes estructurales de los hongos. Las diferentes tinciones en el laboratorio microbiológico tienen una utilidad fundamental para el diagnóstico y tratamiento oportuno de múltiples patologías de etiología infecciosa.

Abstract

Stains in microbiology lab are the first tools employed for diagnosis of infectious diseases. Stains have helped to identify the etiology of microbial involvement for more than a century. As the wide spectrum of stains is currently in progress for the detection of bacteria, fungus and parasites, such fundamentals as the Gram stain are still considered basic for initial evaluation of bacteriological samples, while the Wright stain is used for very particular diseases as those related to parasites. Other specific tintorial methods as the Ziehl-Neelsen stain are used for diagnosis of chronic diseases such as tuberculosis or actinomycosis. The lactophenol blue stain is best employed for diagnosis of fungal infections, as it helps to identify fungi and to preserve their morphological structures. Different stains in the clinical microbiological lab are permanent basic tools for the diagnosis and treatment of many diseases of infectious etiology.

Introducción

En microbiología el microscopio se utiliza de forma rutinaria, ya que proporciona importante información para la identificación temprana y definitiva de los microorganismos.¹ En la valoración de las muestras, es trascendente el poder de resolución del microscopio, el cual se define como la capacidad que posee un objetivo para distinguir la distancia mínima entre dos puntos del objeto para que se puedan visualizar como dos puntos separados. El poder de resolución de un objetivo es el responsable de la calidad, claridad,

nitidez y fineza detallada de la imagen, y depende de la longitud de onda (λ) del haz de luz utilizado y de la apertura numérica del objetivo empleado. El máximo poder de resolución en un microscopio de luz emitida es de 0.2 μm , por lo que se requiere de una amplificación entre 1000-1400x, mientras que el poder de resolución del ojo humano es de aproximadamente 0.2 mm. Para aprovechar esta ventaja de los microscopios, se han desarrollado técnicas tintoriales que destacan las características morfológicas de los microorganismos.² Existe una gran variedad de tinciones que pueden ser aplicadas dentro del campo de la microbiología.³

Un colorante se define como una sustancia capaz de dar color a células, tejidos, fibras, etcétera. De acuerdo con su origen, se pueden dividir en: colorantes naturales, los cuales son extraídos de plantas o animales, y colorantes artificiales, que son aquellos de minerales procesados y manipulados en el laboratorio.

Químicamente, el colorante está constituido de un componente cromóforo y un auxócromo. El cromóforo es todo grupo aislado, covalente e insaturado, que tiene una absorción característica en la región ultravioleta o visible; dicho de otra forma, es la capacidad que tiene la molécula para que sus electrones absorban energía o luz visible, se exciten y emitan diversos colores de acuerdo con la longitud de emitida como resultado del cambio en el nivel energético. Cabe mencionar que esta longitud de onda corresponde al rango de espectro visible. Los cromóforos se pueden presentar en dos formas fundamentales: en sistemas conjugados *pi* o complejos metálicos. Los cromóforos son principalmente grupos funcionales con dobles y triples enlaces carbono-carbono, anillos aromáticos, grupos carbonilos, imino, diazo, nitro y enlaces entre carbono-y (y es un átomo con pares libres). Los auxócromos son grupos funcionales o radicales que constituyen una molécula y poseen carga parcial positiva; tienen la función de intensificar la formación de color mediante la acción de grupos de átomos no saturados; su función es desplazar a los cromóforos hacia longitudes de ondas largas para aumentar la intensidad. Los siguientes grupos funcionales son considerados auxócromos: grupo metilo, halógenos, hidroxilo, alcoxi y amino.^{4,5} Aunque los microorganismos vivos se pueden observar directamente en fresco al microscopio óptico, la mayoría de las veces es necesario teñirlos para que por medio del uso de colorantes, sea mucho más fácil su identificación;⁶ además, la presencia de ciertas estructuras, así como su reacción a determinadas técnicas, nos permite clasificar a las bacterias. Así pues, los colorantes tienen las siguientes funciones:

1. Permiten hacer visibles a los objetos microscópicos y transparentes.
2. Revelan su forma y tamaño.
3. Muestran la presencia de estructuras internas y externas.
4. Producen reacciones químicas específicas.

Las tinciones se pueden clasificar como simples cuando toda la muestra se tiñe del mismo color y se utiliza un sólo colorante (azul de lactofenol o tinta china); tinción diferencial, cuando se visualiza más de un color porque se utiliza más de un colorante

(Gram o Ziehl-Neelsen); tinción específica, cuando se utilizan anticuerpos marcados con una molécula fluorescente para identificar una estructura celular en particular (inmunocitoquímico).^{2,7} El control de calidad de los métodos tintoriales es importante, ya que así se asegura que la preparación de la muestra haya sido adecuada, por lo que se recomienda realizar al mismo tiempo de la evaluación de la muestra clínica, la tinción de un agente infeccioso ya identificado mediante esa tinción, el cual funcionará como un control positivo.

Algunas técnicas tintoriales como Gram o Ziehl-Neelsen requieren antes de su proceso la fijación de las muestras, con la finalidad de preservar la arquitectura estructural y química de las células.³ Existen dos tipos de fijadores: físicos y químicos. Entre los procesos de fijación físicos se tienen los siguientes: desecación, calor seco, calor húmedo, ultrasonido y microondas, mientras que los procesos de fijación químicos se pueden clasificar como oxidantes y reductores, de acuerdo con sus propiedades químicas. Entre los agentes químicos oxidantes se encuentran: óxido crómico, ácido acético, ácido pícrico, acetona, dicromato de potasio. Los agentes químicos reductores son: formaldehído, glutaraldehído, etanol, metanol, paraldehído, etcétera.⁸

Quizá el método físico con mayor utilización en microbiología es el calor seco, que consiste en exponer directamente la laminilla a la flama del mechero, con esto se logra detener los procesos vitales de las células y los microorganismos. Sin embargo, la sobreexposición, o la exposición en una zona incorrecta de la flama (zona fría, zona caliente y zona de fusión) repercutirá en el efecto deseado; es muy común provocar alteraciones morfológicas y destrucción celular. Este método preserva el extendido por poco tiempo, por lo que se recomienda utilizar un método químico, que precipite proteínas, antes de teñir.

Los métodos químicos ofrecen mejores resultados para la fijación, ya que son líquidos con potencial alto de difusión intracelular y detienen procesos enzimáticos que provocan autólisis. Los reactivos poseen la capacidad de interactuar con biomoléculas como proteínas, glicoproteínas, peptidoglicanos, lípidos, glicolípidos, lipoproteínas, pigmentos, ácidos pépticos y nucleicos. El metanol es el reactivo que se encuentra al alcance de todos los laboratorios; es un reactivo reductor, deshidratador, y es clasificado como fijador coagulante, de tal manera, coagula proteínas y las hace insolubles, pero sin desnaturalizarlas. Se preserva la arquitectura de la pared celular y evita la sobrecoloración. El metanol tiene un potencial reductor mayor que el etanol. La concentración ideal es >

99%. El metanol preserva la integridad de los ácidos nucleicos, por lo que también es ideal para inmunohistoquímica e hibridación in situ.^{3,8,9}

A continuación se mencionarán las principales técnicas de tinción utilizadas en microbiología, así como su fundamento e interpretación para realizar la correcta identificación de los microorganismos.

Tinción de Gram

Esta tinción es un procedimiento de gran utilidad empleado en los laboratorios donde se manejan pruebas microbiológicas. Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas.¹⁰ Fue desarrollada por el científico danés Hans Christian Gram en 1884; hoy en día, sigue siendo una de las tinciones más utilizadas universalmente debido a lo económico, sencillo y eficaz que resulta.¹¹ En microbiología clínica resulta de gran utilidad, ya que a partir de muestras clínicas directas provenientes de sitios estériles se puede saber de manera rápida las características de la muestra y hacer una diferencia de los potenciales microorganismos causantes de una infección.¹² Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared

celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa; así pues, la composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas y Gram positivas explica y determina las características tintoriales (Figura 1).¹³⁻¹⁵ La tinción de Gram se basa en colocar como colorante primario cristal violeta, el cual tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana. Posteriormente, se coloca lugol, el cual sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violeta-yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana. En seguida, se coloca una mezcla de alcohol-acetona, la cual deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de la misma, también destruye la membrana externa de las bacterias Gram negativas debido a que ésta es soluble a la acción de solventes orgánicos, como la mezcla de alcohol-acetona. Las bacterias Gram positivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza este complejo, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener por tener menos cantidad de peptidoglicano. Por último, se coloca safranina, la cual funciona como un colorante secundario o de contratinción y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo.¹⁶ Hay bacterias de un mismo género que pueden observarse en la misma muestra como Gram positivas y como Gram negativas, a este evento se le llama tinción Gram variable secundaria a alteración en nutrientes, temperatura, pH o concentración de electrolitos.¹⁷ No todas las bacterias se pueden teñir por esta técnica,

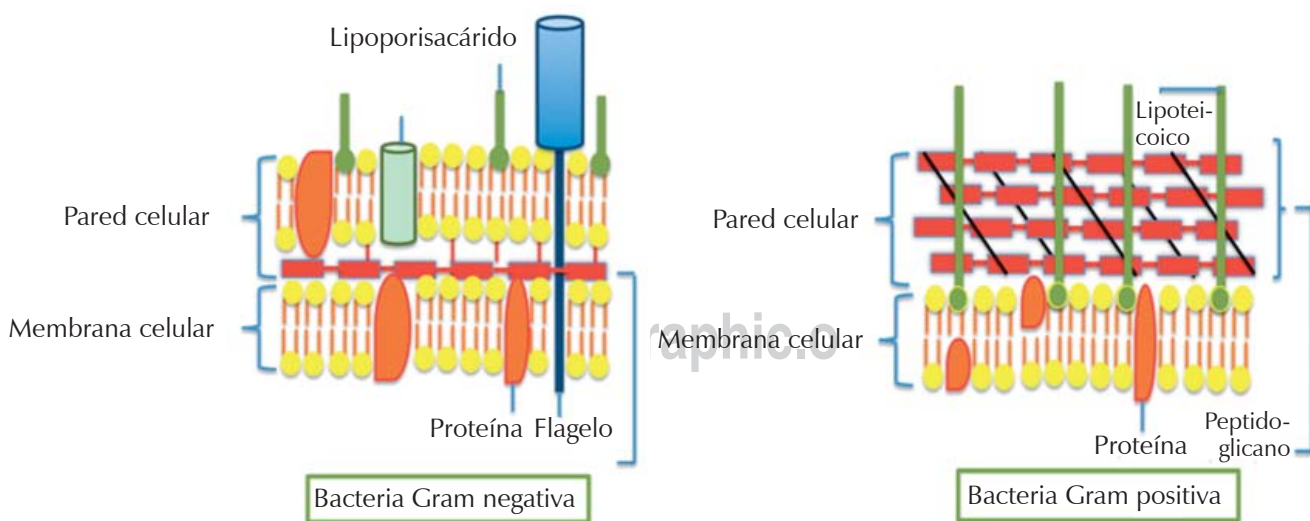


Figura 1. Esquema de las diferencias estructurales entre bacterias Gram negativas y Gram positivas.

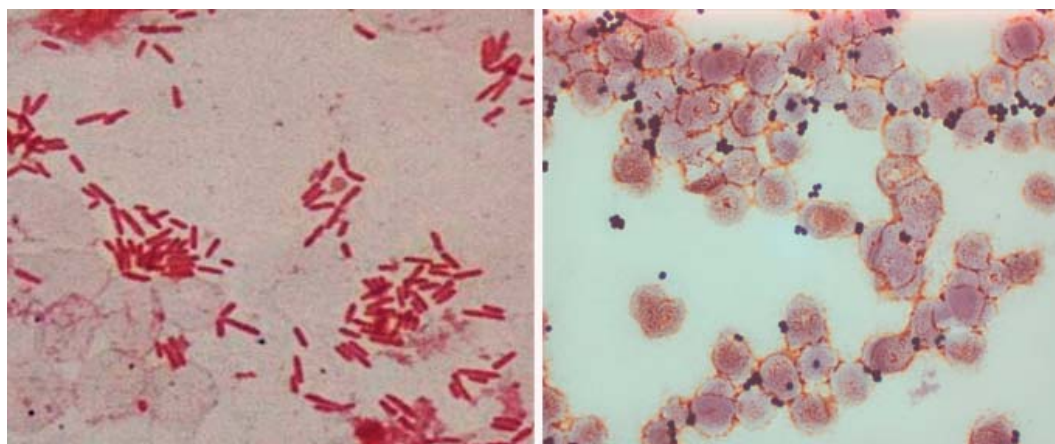


Figura 2.

Fotomicrografía donde se observan bacterias Gram negativas en cultivo directo (izquierda) y Gram positivas en hemocultivo (derecha) (aumento 100x).

Imagen en color en: www.medigraphic.com/rid

ya que carecen de pared celular (micoplasma) o su pared celular tiene una composición química diferente (micobacterias, que cuentan con una gran cantidad de ácidos micólicos).^{18,19} Las muestras útiles para su uso son líquidos estériles, biopsias para cultivo, abscesos, hisopados, crecimiento de colonias aisladas en medios de cultivo. Las bacterias Gram positivas se observan de color azul oscuro a morado, mientras que las Gram negativas se observan de color rosa a rojo (*Figura 2*).

Tinción de Wright

La tinción de Wright es una técnica que se emplea generalmente para la diferenciación de elementos celulares de la sangre y es clasificada como una tinción policromática, dado que puede teñir compuestos ácidos o básicos presentes en una célula.²⁰ Fue desarrollada por el patólogo James Homer Wright en 1902 a partir de la modificación de la ya existente tinción de Romanowsky, utilizada para diferenciar elementos formes de la sangre.²¹ Esta tinción tiene diversos usos en microbiología; en la parasitología, se le emplea en la búsqueda de hematozoarios como *Plasmodium spp.* El reactivo de Wright está compuesto por eosina y azul de metileno, cuando éste se oxida se conoce como *azur B* a una concentración de 0.8 g/L empleando como solvente alcohol metílico. La eosina es un colorante ácido que tiene afinidad por componentes alcalinos. Existen dos compuestos conocidos como eosina y que están intrínsecamente relacionados: eosina Y, conocida también como tetrabromofluoresceína –o, comúnmente, eosina amarilla–, y la eosina B, conocida como dibromodinitrofluoresceína o eritrosina B azulada.^{20,21} Ambos compuestos son intercambiables, sin que sean notables las diferencias entre ellos en el resultado de la tinción, por lo que la preferencia de una sobre otra

no sigue un criterio objetivo. A pesar de ello, la eosina Y es la más utilizada en procedimientos rutinarios. Es un compuesto ácido cuya propiedad está basada en su polaridad negativa, lo que le permite enlazarse con constituyentes celulares de carga positiva; por esta razón, colorea componentes citoplasmáticos y se les conoce como acidófilos. La tonalidad resultante de la tinción con eosina es rosada-anaranjada para citoplasmas, y rojo intenso en el caso de los eritrocitos.^{21,20} El típico color de los núcleos celulares, mayoritariamente morado, se basa en la interacción molecular entre eosina y un complejo azul de metileno-DNA. La intensidad de la coloración depende del contenido de azur B y de la relación con la eosina amarilla. El resultado de la tinción puede ser influido por diferentes factores, como el valor del pH de los colorantes y de la solución amortiguadora, esto debido a que la tinción se funda-



Figura 3. Fotomicrografía de trofozoitos jóvenes de *Plasmodium vivax* observados mediante la tinción de Wright (aumento 100x).

Imagen en color en: www.medigraphic.com/rid

menta en la relación de las características ácido-base, y la variación de estos factores podría cambiar las características tintoriales de la muestra a teñir al verse favorecida por características más ácidas o básicas.²¹ Las muestras útiles para su uso son el frotis de sangre periférica y frotis de médula ósea. Los diferentes colores que se observan en la célula provocan el llamado efecto Romanowsky, que tiñe de púrpura a los núcleos y gránulos neutrofílicos y de color rosa al citoplasma. Los ácidos nucleicos se tiñen de azul, permitiendo así distinguir a los parásitos en el interior de los eritrocitos. Esta tinción es utilizada en la búsqueda de *Plasmodium spp.* (en México, principalmente, *Plasmodium vivax*), *Leishmania spp.*, (principalmente *Leishmania mexicana*), *Trypanosoma cruzii*, y en la búsqueda intencionada de filarias (Figura 3). En micología esta tinción es de gran ayuda en la búsqueda de *Histoplasma capsulatum* (hongo dimórfico) en extendidos de médula ósea.

Tinción de Ziehl-Neelsen

La tinción de Ziehl-Neelsen es la técnica comúnmente usada en el diagnóstico rutinario de tuberculosis.^{22,23} Es una técnica rápida, fácil y de bajo costo,²⁴ lo que permite que se pueda realizar en casi cualquier laboratorio clínico. Esta tinción permite diferenciar a las bacterias en dos grupos: aquellos que son capaces de resistir la decoloración con alcohol-ácido y aquellos que no lo son.²⁵ La sensibilidad de esta tinción para identificar bacilos ácido-alcohol resistentes es del 74%

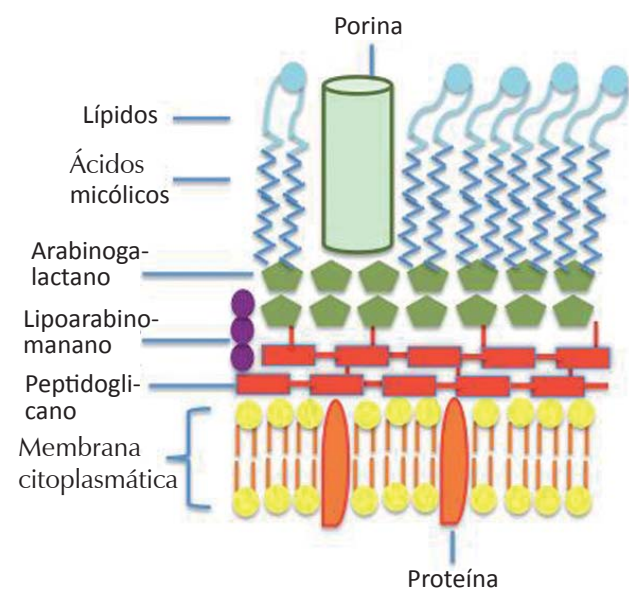


Figura 4. Representación esquemática de la composición de la pared celular de las micobacterias.

y la especificidad del 98%,²⁶ teniendo un límite de detección de 5,000-10,000 bacilos/mL de muestra.²⁷ El agente etiológico de la tuberculosis fue descrito por Heinrich Hermann Robert Koch, quien, basándose en las características de las micobacterias, desarrolló una de las primeras tinciones utilizando azul de metileno seguido de la tinción de Bismarck. Sin embargo, fueron los trabajos de Paul Ehrlich los que definieron la resistencia a la decoloración por alcohol-ácido, y las últimas modificaciones a la tinción fueron realizadas por los científicos alemanes Franz Ziehl y Karl Adolf Neelsen.²⁶ El género *Mycobacterium* es el único miembro en la familia *Mycobacteriaceae* y está relacionado con otros géneros que contienen ácidos micólicos

Cuadro I. Evaluación y reporte de las laminillas teñidas por Ziehl-Neelsen.

Reporte	Número de bacilos ácido-alcohol resistentes teñidos por Ziehl-Neelsen. Objetivo de inmersión (100X)
Negativo	0
Dudoso/ repetir	1-2/300 (3 barridos) C ^a
1+	1-9/100 C ^a (1 barrido)
2+	1-9/10 C ^a
3+	1-9/C ^a
4+	> 9/C ^a

C^a = campos del microscopio

Barrido.- Se refiere las observaciones de la laminilla

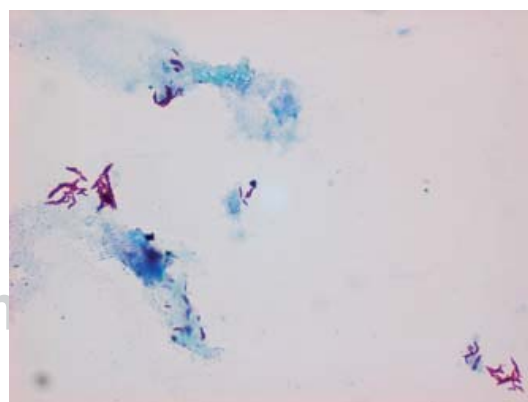


Figura 5. Fotomicrografía de una muestra de expectoración donde se observan los bacilos de color rojo fucsia (*Mycobacterium spp.*) (aumento 100x).

Imagen en color en: www.medigraphic.com/rid

(*Gordonia*, *Tsukamurella* y *Rhodococcus*), los cuales también pueden ser teñidos con esta tinción.^{20,25,28} La pared celular de las micobacterias es extremadamente compleja en cuanto a su composición bioquímica; dicha característica es la que se ha aprovechado para realizar la tinción de Ziehl-Neelsen. La pared celular está compuesta por ácido mesodiaminopimélico, alanina, ácido glutámico, glucosamida, ácido murámico, arabinosa y galactosa (Figura 4). Los ácidos micólicos (70-90 número de átomos de carbono) junto con lípidos libres (ej. trealosa-6,6'-dimicolato) proveen a la célula de una barrera hidrofóbica. Otros ácidos grasos importantes son: ceras, fosfolípidos, ácidos micoséricos y phtienoico.¹⁸

La tinción se basa en colocar carbol-fucsina y calentar la preparación ligeramente para solubilizar las ceras, lípidos y otros ácidos grasos de la pared celular para que permita el paso libre del colorante, el cual tiene una enorme afinidad por los ácidos micólicos presentes en la pared. Al enfriar con agua, los componentes de la pared vuelven a solidificar, resistiendo la acción abrasiva del alcohol-ácido, y el azul de metileno se utiliza como contratinción (Figura 5).¹⁸ Las muestras clínicas útiles para su uso son múltiples, como el líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido sinovial, líquido pericárdico, biopsias para cultivo, abscesos, aspirados, crecimiento de colonias aisladas en medios de cultivo, expectoraciones, aspirados endotraqueales y lavados bronquioalveolares. Una tinción positiva es aquella en la que se observan bacilos ácido-alcohol resistentes, los cuales son de color rojo fucsia. La evaluación y reporte de las laminillas se realiza de acuerdo al cuadro I.

Tinción negativa

La tinción negativa fue desarrollada originalmente para microscopía de luz con el fin de rodear y delinear las bacterias no teñidas u otros materiales biológicos.⁶

Utilizamos diferentes métodos de tinción negativa para evaluar estructuras individuales, tan pequeñas como las vesículas sinápticas e incluso de gran tamaño, como los microorganismos unicelulares. Este método es muy útil, aunque está limitado por la presencia de un fondo oscuro que no permitirá la correcta identificación de forma nítida y detallada de los componentes de dichas estructuras.²⁹ En microbiología, la tinción negativa proporciona un resultado presuntivo de la presencia de *Cryptococcus neoformans*, microorganismo causante de meningitis en pacientes con inmunosupresión, siendo la técnica más utilizada para poner de manifiesto su cápsula. Este hongo presenta dos formas durante su ciclo vital: una forma asexual y una forma sexual; en la primera se presenta como levaduras encapsuladas que se reproducen por gemación y puede ser visualizada por medio de la tinta china.²⁹⁻³¹ El principio es simple, ya que sólo se requiere depositar una gota de la muestra clínica sobre un portaobjetos, posteriormente se coloca el colorante y se observa al microscopio sin necesidad de fijación, algunas estructuras difundirán el colorante y otras no, lo que permitirá un contraste de las estructuras observadas. Se han utilizado diferentes colorantes: uno de ellos es la mencionada tinta china, la cual tiñe el fondo de la muestra de un color oscuro y la cápsula del *C. neoformans* permanece sin teñir. La principal dificultad con la tinción negativa es que los microorganismos tienden a contraerse durante el periodo de secado;³¹ para evitarlo, se ha optado por usar la tinción negativa húmeda, en la cual los organismos se suspenden en una película de tinta china o mancha oscura y el contorno de la cápsula puede ser observado sin el peligro de contracción. Además de ser una técnica sencilla, es muy barata, ya que no requiere equipos o material costoso para su realización.³¹ Pueden producirse falsos positivos en presencia

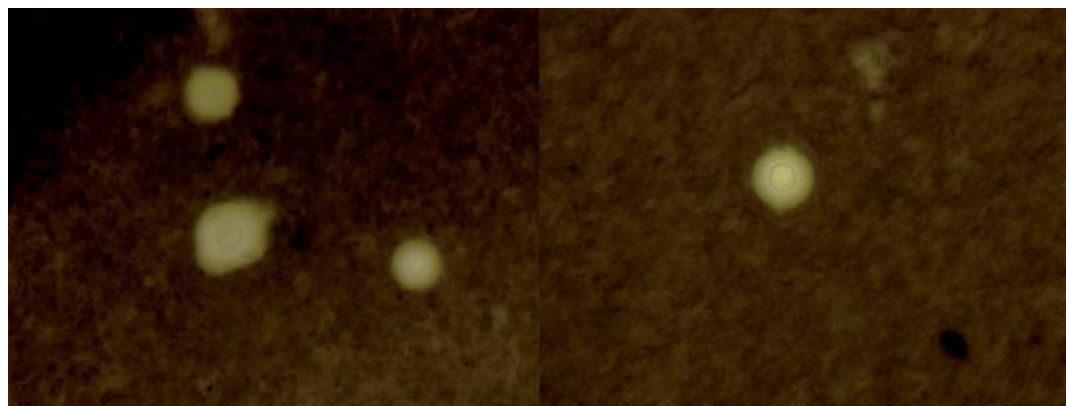


Figura 6.

Preparación de *Cryptococcus neoformans* en tinta china que revela la llamativa cápsula que circunda a las levaduras de gemación (aumento 40x).

Imagen en color en: www.medigraphic.com/rid

de levaduras de los géneros *Rhodotorula*, *Candida* y otras especies de *Cryptococcus*, igual que por artificios como los leucocitos. Es importante diferenciar bien la levadura con doble pared refringente, con su cápsula, y siempre hay que confirmar el diagnóstico inicial con cultivo.³² En los pacientes con diagnóstico previo de criptococosis que se encuentren bajo tratamiento, es probable que la cápsula no se observe, ya que el tratamiento antifúngico está dirigido hacia ésta; sin embargo, pueden observarse estructuras levaduriformes. Además de proporcionar información temprana sobre un microorganismo patógeno y propiciar así el inicio del tratamiento adecuado, se considera un examen útil para la monitorización del tratamiento y pronóstico de los pacientes.³² Se recomienda utilizar como control negativo una gota de tinta china y colocarle un cubreobjetos; esto permitirá discernir entre burbujas formadas al agregar el cubreobjetos o el acúmulo de partículas que podrían crear una zona de aclaramiento que pudiera confundir al realizar la revisión de las laminillas. Durante el procedimiento de la tinción se deben tener precauciones, por lo que se debe realizar en una campana de bioseguridad 2A. La muestra más útil para su aplicación es el líquido cefaloraquídeo, por la predisposición que tiene este hongo en los pacientes inmunosuprimidos para infectar el sistema nervioso central. La cápsula aparece como un halo claro y nítido en torno a una levadura redonda, delimitada por las partículas de carbón en suspensión coloidal de la tinta china, exhibiendo un nítido contraste (Figura 6).

Tinción de azul algodón de lactofenol

El examen microscópico es de gran importancia en micología para la observación de las diferentes especies de hongos de interés clínico. Se deben utilizar tinciones que logren preservar la integridad de las estructuras fúngicas.¹⁸ Para la correcta identificación de hongos de interés clínico, ya sea con fines de diagnóstico o estudios taxonómicos, es necesario observar las estructuras fúngicas con una alta calidad y contraste; para ello se utilizan diversos compuestos químicos que permitan la tinción entre la pared y el citoplasma de las células fúngicas.³¹ La tinción de azul algodón de lactofenol no es considerada una tinción diferencial, sin embargo, posee características tintoriales que permiten observar cada uno de los componentes fúngicos y apreciar fácilmente las estructuras para una adecuada identificación. El fenol inactiva las enzimas líticas de la célula e impide que ésta se rompa; de igual forma, destruye la flora acompañante e inactiva a la célula, quitándole el grado de patogenicidad; además, actúa

como mordiente cuando se usa en combinación con colorantes. El ácido láctico preserva las estructuras fúngicas al provocar un cambio de gradiente osmótico con relación al interior fúngico, lo que genera una película protectora. El azul de algodón es un colorante ácido, que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, mientras que el glicerol mantiene húmeda la preparación.²⁹⁻³¹ Una vez preparado el colorante, se debe colocar la muestra microbiológica en un portaobjetos por medio de una impronta (proceso en el cual se coloca una impresión de la muestra sobre una estructura utilizando una cinta adhesiva transparente).

Preparación de la impronta

1. Colocar el material necesario en la campana de seguridad tipo 2A.
2. Seleccionar las colonias para realizar las improntas.
3. Cortar segmentos de cinta adhesiva transparente aproximadamente de 1 cm².
4. Pegar los segmentos de cinta en un asa micológica.
5. Poner una gota de azul de algodón en el portaobjetos.
6. Con el lado adhesivo de la cinta, tocar la parte superior de hongo.
7. Colocar la cinta sobre la gota de azul de algodón y poner otra gota de azul de algodón.
8. Poner un cubreobjetos sobre la preparación.
9. Observar en 40x.
Ver Figura 7.

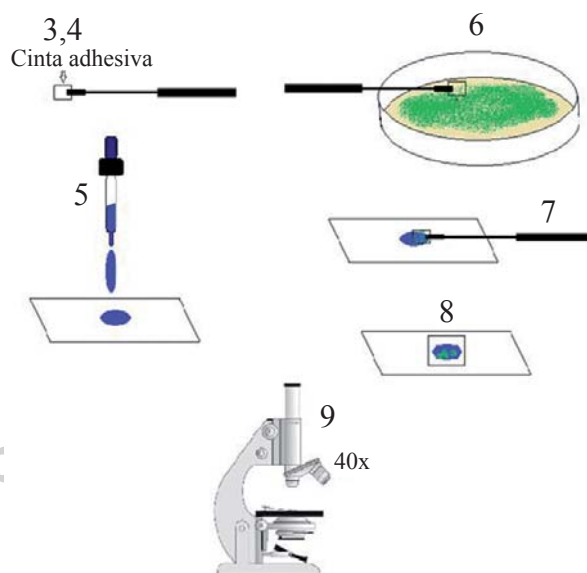


Figura 7. Representación esquemática de la preparación de la impronta para la observación de hongos filamentosos (paso 3 a 9).



Figura 8.

Fotomicrografía de hongos filamentosos con el método de azul algodón de lactofenol. *Exserohilum* sp. (izquierda); *Mucor* spp. (derecha) (aumento 40x).

Imagen en color en:
www.medigraphic.com/rid

La manipulación de los hongos filamentosos siempre debe llevarse a cabo en una campana de seguridad tipo 2A, ya que la mayoría de éstos son patógenos, y realizar una técnica inadecuada puede poner en riesgo al personal. Cuando se identifique la presencia de un hongo filamentosos, se sugiere realizar el pase a una placa en medio dextrosa Sabouraud, para poder realizar una mejor manipulación e identificar con mayor facilidad las características macroscópicas, tanto en la parte anterior como posterior de la placa. Se debe realizar la impronta con cuidado de no oprimir demasiado las estructuras, ya que se pueden dañar. Una vez hecha se debe realizar su pronta lectura, ya que en muchos casos la formación de esporas o conidias es muy importante para la identificación, y en ocasiones es difícil la observación en cultivos viejos o demasiados jóvenes. En algunas ocasiones sólo se llegan a observar hifas sin lograr definir otras estructuras (cultivos jóvenes, se observan micelios infértiles), por lo que se recomienda someter al hongo a condiciones donde no se favorezca su crecimiento, como por ejemplo, el uso por corto tiempo de luz UV (para hongos productores de pigmento) o la siembra en medios con pocos nutrientes, como agar-agua, agar dextrosa-papa, agar hojuelas de maíz (*cornmeal*, en inglés), e incluso utilizar un soporte de celulosa, como papel filtro estéril, esto favorece la conidiación y esporulación. Es de suma importancia apoyarse de un atlas micológico para la interpretación microscópica. Muestras útiles para su uso son los hongos filamentosos aislados en medios de cultivo. Las estructuras fúngicas se observarán de color azul sobre un fondo blanco (Figura 8).

Conclusiones

Las tinciones utilizadas en el laboratorio de microbiología permiten el diagnóstico oportuno y sugerente de los agentes infecciosos, por lo que juegan un papel

importante en la decisión del tratamiento inicial de las enfermedades infecciosas. Se debe practicar la tinción adecuada de acuerdo con el agente infeccioso en sospecha y el tipo de muestra clínica. Las tinciones son herramientas elementales, vigentes y de uso universal que coadyuvan al diagnóstico microbiológico.

Bibliografía

1. Decré D, Barbut F, Petit JC. Role of the microbiology laboratory in the diagnosis of nosocomial diarrhea. *Pathol Biol (Paris)*. 2000; 48: 733-744.
2. Keller PJ. Imaging morphogenesis: technological advances and biological insights. *Science*. 2013; 340: 123-168.
3. Madison BM. Application of stains in clinical microbiology. *Biotech Histochem*. 2001; 76: 119-125.
4. Luis SBM, Altava B. Introducción a la química orgánica. Universitat Jaume;1997.
5. Fung DC, Theriot JA. Imaging techniques in microbiology. *Curr Opin Microbiol*. 1998; 1: 346-351.
6. Ronay V, Attin T. Black stain –a review. *Oral Health Prev Dent*. 2011; 9: 37-45.
7. Guarner J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin Microbiol Rev*. 2011; 24: 247-280.
8. Calvo GA, Esteban RFJ, Montuenga FL. Técnicas en histología y biología celular. 2nd ed. Madrid Spain: Elsevier; 2009.
9. Clodfelter RL Jr. The peripheral smear. *Emerg Med Clin North Am*. 1986; 4: 59-74.
10. Beveridge TJ. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*. 2001; 76: 111-118.
11. Kaplan ML, Kaplan L. The Gram stain and differential staining. *J Bacteriol*. 1933; 25: 309-321.
12. Nagata K, Mino H, Yoshida S. Usefulness and limit of Gram staining smear examination. *Rinsho Byori*. 2010; 58: 490-497.
13. Breakwell DP, Moyes RB, Reynolds J. Differential staining of bacteria: capsule stain. *Curr Protoc Microbiol*. 2009. Appendix 3: p. Appendix 3I.

14. Beveridge TJ, Graham LL. Surface layers of bacteria. *Microbiol Rev.* 1991; 55: 684-705.
15. Coico R. Gram staining. *Curr Protoc Immunol.* 2001. Appendix 3: p. Appendix 3O.
16. Popescu A, Doyle RJ. The Gram stain after more than a century. *Biotech Histochem.* 1996; 71: 145-151.
17. Beveridge TJ. Mechanism of Gram variability in select bacteria. *J Bacteriol.* 1990; 172: 1609-1620.
18. Murray P. *Manual of clinical microbiology.* 9th ed. USA: American Society for Microbiology; 2007.
19. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62: 1094-1156.
20. Koneman E. *Diagnóstico microbiológico.* 6a ed. México DF: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2006.
21. Forbes BA, Sahm D, Weissfeld A. *Bailey & Scott. Diagnóstico microbiológico.* 12a ed. Editorial Médica Panamericana S.A.; 2009.
22. Ben-Selma W et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by Patho-TB kit in comparison with direct microscopy and culture. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 65: 232-235.
23. Chen P et al. A highly efficient Ziehl-Neelsen stain: identifying de novo intracellular *Mycobacterium tuberculosis* and improving detection of extracellular *M. tuberculosis* in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 1166-1170.
24. Selvakumar N et al. Inefficiency of 0.3% carbol fuchsin in ziehl-neelsen staining for detecting acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 3041-3043.
25. Prescott LM. *Microbiology.* 5th ed. USA: McGraw-Hill; 2002.
26. Selvakumar N et al. Comparison of variants of carbol-fuchsin solution in Ziehl-Neelsen for detection of acid-fast bacilli. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005; 9: 226-229.
27. Salud OPDL. *Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis.* Vol. 1. 2008.
28. Arredondo GCJ. *Conceptos clínicos de infectología.* 10a ed. México DF: Méndez Editores; 1995.
29. Farrant JL. An electron microscopic study of ferritin. *Biochim Biophys Acta.* 1954; 13: 569-576.
30. Ohi M et al. Negative staining and image classification - powerful tools in modern electron microscopy. *Biol Proced Online.* 2004; 6: 23-34.
31. Mc KR. Staining bacterial polysaccharides. *J Bacteriol.* 1953; 66: 453-454.
32. Larone DH. *Medical important fungi. A guide to identification.* 5th ed. USA: American Society for Microbiology; 2011.