

- 
- **Materia: Métodos, instrumentos y técnicas de diagnóstico veterinario.**
  - **Tema: Tipos de tinciones.**
  - **Carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia.**
  - **Cuatrimestre: 3ro.**
  - **Alumno: Alba Paulina Gómez Alvaro.**

Una tinción o coloración es una técnica auxiliar utilizada para mejorar el contraste en la imagen vista al microscopio. Los colorantes son sustancias que usualmente se utilizan para aumentar la definición y examinar poblaciones celulares. Se usa un único colorante, que siempre es de tipo básico. Estas tinciones son de gran importancia para la medicina veterinaria, a continuación las tinciones mas utilizadas:

## **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. 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. 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. 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. 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 violetayodo 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 alcoholacetona. 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. 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. No todas las bacterias se pueden teñir por esta técnica 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). 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.

### **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. 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. 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.<sup>20,21</sup> 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. 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 azul 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. 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 neutrofilicos 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.

### **Tinción de Ziehl-Neelsen**

La tinción de Ziehl-Neelsen es la técnica comúnmente usada en el diagnóstico rutinario de tuberculosis. Es una técnica rápida, fácil y de bajo costo, 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. La sensibilidad de esta tinción para identificar bacilos ácido-alcohol resistentes es del 74% y la especificidad del 98%,<sup>26</sup> teniendo un límite de detección de 5,000-10,000

bacilos/mL de muestra. 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. El género *Mycobacterium* es el único miembro en la familia *Mycobacteriaceae* y está relacionado con otros géneros que contienen ácidos micólicos. 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. Los ácidos micólicos (70-90 número de átomos de carbono) junto con lípidos libres proveen a la célula de una barrera hidrofóbica. Otros ácidos grasos importantes son: ceras, fosfolípidos, ácidos micoséricos y phtienoico.

## **Tinción negativa**

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

## **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. 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. 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. 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).