

PRESENTA:

Erick Villegas Martínez

MATERIA:

Microbiología y parasitología

DOCENTE:

Ing. Enrique Eduardo Arreola

TEMA:

Tinciones compuestas Ziehl-Neelse, y de Giemba.

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% 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 (*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 contra tinción. 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.

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

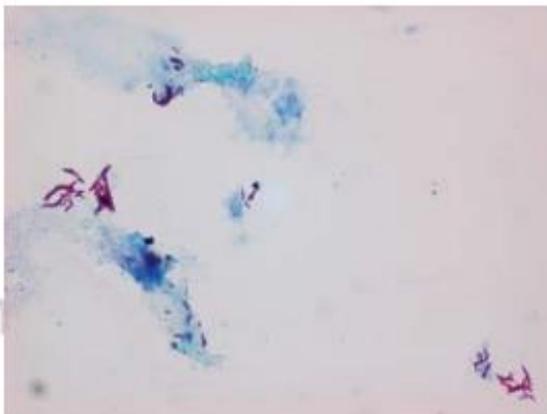


Figura 5. Fotomicrografía de una muestra de expectoración donde se observan los bacilos de color rojo fucsia (*Mycobacterium* spp)(aumento 100x).

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

Tinciones Hematológicas - Giemsa

Las tinciones hematológicas pueden definirse como el conjunto de técnicas o procedimientos necesarios para teñir los elementos celulares de la sangre, para poder ser observados e identificados bajo el microscopio. Para ello es necesario hacer uso de colorantes, los cuales interactúan con los componentes celulares de la sangre y los tiñen según su afinidad química. Existen varias técnicas de coloraciones para células sanguíneas, pero las técnicas basadas en coloraciones tipo Romanowsky son de las utilizadas con mayor frecuencia.

Los colorantes tipo Romanowsky consisten en mezcla de colorantes ácidos (eosina) y básicos (Azul de metileno, azur A, azur B y azur C) y fue utilizada por primera vez por el químico Dmitry Leonidovich Romanowsky para evidenciar el núcleo del parásito del paludismo, para ello, se basó en la idea del Teñido Neutro de Erlich, que consiste en dejar que un colorante básico reaccione con otro ácido para dar lugar a un compuesto de nuevas propiedades. De esta forma, combinada la eosina, colorante ácido, con el azul de metileno, colorante básico derivado de las tiazinas, obtuvo no sólo una aceptable visualización del parásito del paludismo, sino también una amplia gama de colores que, aplicados a las células sanguíneas, constituyen el principio básico para la observación morfológica en el microscopio.

Posteriormente, la técnica de Romanowsky fue perfeccionada por Leishman y Jenner, en Inglaterra y por May-Grünwald y Reuter, en Alemania, quienes consiguieron una mayor estabilidad de los colorantes y una mayor reproducibilidad del método de tinción aplicado a las extensiones de células sanguíneas. Siendo así, como el colorante de Romanowsky pasó a ser la base de colorantes como Wright, Giemsa o Leishman.

En el laboratorio clínico, la tinción de Giemsa es una de las más utilizadas por su facilidad metodológica y por la calidad de sus propiedades diferenciales. La tinción de Giemsa está catalogada como tinción tipo Romanowsky, el cual básicamente es una solución en metanol de un colorante ácido (eosina) y dos colorantes básicos (azur y azul de metileno). Estos colorantes teñirán las estructuras celulares dependiendo de su carácter ácido o básico.

Estas coloraciones permiten distinguir los siguientes aspectos morfológicos y estructuras celulares:

- Forma, dimensiones y contorno de las células sanguíneas.
- Núcleo celular y restos de cromatina, de color púrpura.
- Citoplasma de linfocito, en color azul.
- Citoplasma de monocitos, color grisáceo.
- Granulaciones de los polimorfos nucleares.
- Eritrocitos, de color rosa pálido
- Reticulocitos, color azulado.

Material

- Frotis sanguíneo seco y rotulado.
- Cubeta.
- Varillas paralelas.
- Frasco lavador con agua destilada.
- Pipetas pasteur.
- Cronómetro.

Reactivos

- Metanol como solución fijadora.
- Colorante de Giemsa.

Técnica

1. Llenar de agua la cubeta para que los colorantes no se peguen al fondo.
2. Colocar las varillas paralelas sobre los bordes de la cubeta.
3. Colocar las extensiones sanguíneas sobre las varillas paralelas.
4. Cubrir las extensiones con metanol y esperar 4-5 minutos.
5. Decantar para eliminar el metanol.

6. Cubrir las extensiones con solución extemporánea de Giemsa recién diluida a 1/10 (1 gota de Giemsa por 9 gotas de agua destilada) y dejar actuar durante 25 minutos.
7. Lavar las extensiones con agua destilada para eliminar los restos de colorante.
8. Secar las extensiones al aire, colocas en vertical.
9. Observar los frotis sanguíneos teñidos al microscopio óptico.

