



UNIVERSIDAD DEL SURESTE (UDS).

ASESOR: DR. ENRIQUE EDUARDO ARREOLA JIMENEZ.

ALUMNA: EVELIN SAMIRA ANDRES VELAZQUEZ.

MATERIA: MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA.

ACTIVIDAD: INVESTIGACIÓN DE TINCIÓN COMPUESTA DE ZIEHL-NEELSE Y DE GIEMBA.

TAPACHULA, CHIAPAS A SÁBADO 02 DE ABRIL DEL 2022.

Contenido

INTRODUCCIÓN.....	3
DESARROLLO.....	3
TINCIÓN DE ZIEHL-NEELEN 3	3
¿Qué es la tinción de Ziehl-Neelsen?	3
Fundamentos:	3
Colorante secundario:	4
Reactivos:	4
Procedimiento de tinción ácido-rápida:.....	4
TINCIÓN DE GIEMSA.....	6
¿Qué es la tinción de Giemsa?	6
Fundamento de la coloración de Giemsa:	7
Materiales:	7
Técnica.....	8
Modo de almacenamiento:.....	9
CONCLUSIÓN.....	9
BIBLIOGRAFÍA.....	9

INTRODUCCIÓN

Una tinción es un procedimiento para visualizar un tejido, células o microorganismos y facilitar su identificación al microscopio, el procedimiento implica el uso de uno o varios colorantes de modo simultaneo o sucesivo.

Ventajas:

Aumentar la resolución

Acentuar las características

morfológicas

Conservar la muestra.

DESARROLLO

TINCIÓN DE ZIEHL-NEELEN

¿Qué es la tinción de Ziehl-Neelsen?

La tinción de Ziehl-Neelsen es una técnica de coloración para identificar microorganismos alcohol-ácido resistentes (AAR). El nombre de este procedimiento de microbiología hace referencia a sus autores: el bacteriólogo Franz Ziehl y el patólogo Friedrich Neelsen.

Esta técnica es un tipo de coloración diferencial, lo que implica el uso de distintos colorantes con la finalidad de crear contraste entre las estructuras que se desean observar, diferenciar y posteriormente identificar.

La tinción de Ziehl-Neelsen sirve para identificar ciertos tipos de microorganismos.

Algunos de estos microorganismos son micobacterias (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*), nocardias (por ejemplo, *Nocardia* sp.) y algunos parásitos unicelulares (por ejemplo, *Cryptosporidium parvum*). Muchas de las bacterias pueden clasificarse a través de una técnica común llamada tinción de Gram.

Algunos grupos bacterianos requieren otros métodos para poder identificarlos. Las técnicas como la tinción de Ziehl-Neelsen requieren combinaciones de colorantes con calor para fijar el primero a la pared celular.

Fundamentos:

El fundamento de esta técnica de tinción se basa en las propiedades de la pared celular de estos microorganismos. La pared está formada por un tipo de ácidos grasos llamados ácidos micólicos; estos se caracterizan por presentar cadenas muy largas.

Cuando los ácidos grasos presentan estructuras muy largas, estos pueden retener los colorantes con mayor facilidad. Algunos géneros de bacterias son muy difíciles de teñir mediante tinción de Gram, debido al alto contenido de ácidos micólicos de la pared celular.

En la tinción de Ziehl-Neelsen se utiliza el compuesto fenólico carbol fucsina, un colorante básico. Este tiene la capacidad de interactuar con los ácidos grasos de la pared celular, la cual es de textura cerosa a temperatura ambiente.

Colorante secundario:

Después de la decoloración de la muestra, esta se contrasta con otro colorante llamado colorante secundario. Generalmente se utiliza el azul de metileno o el verde de malaquita.

El colorante secundario tiñe el material de fondo y, en consecuencia, crea contraste a las estructuras que fueron teñidas en el primer paso. Solo las células decoloradas absorben el segundo colorante (contra-tinción) y toman su color, mientras que las células ácido-resistentes conservan el color rojo.

Este procedimiento se usa frecuentemente para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, las cuales son llamadas bacilos ácido-alcohol resistentes.

Reactivos:

- Colorante primario.

Se usa carbol fucsina al 0,3 % (filtrado). Este colorante se prepara a partir de una mezcla de alcoholes: fenol en etanol (90 %) o metanol (95 %), y en esta mezcla se disuelven 3 gramos de fucsina básica.

- Solución decolorante.

En este paso se pueden emplear soluciones de ácido alcohol al 3 % o ácido sulfúrico al 25 %.

- Colorante secundario (contra-colorante).

El colorante más empleado para realizar el contraste en las muestras suele ser el azul de metileno al 0,3 %. Sin embargo, también se pueden emplear otros, como la verde malaquita al 0,5 %.

Procedimiento de tinción ácido-rápida:

- Preparar un frotis bacteriano:

Esta preparación se hace en un portaobjetos limpio y seco, siguiendo las precauciones de esterilidad.

- Secado del frotis:

Dejar que el frotis se seque a temperatura ambiente.

- Calentar la muestra:

La muestra se debe calentar aplicando fuego al portaobjeto por debajo. Se puede hacer una fijación con alcohol cuando el frotis no se ha preparado con esputo (tratado con hipoclorito de sodio para blanquearlo) y si no se va a teñir inmediatamente.

M. tuberculosis se elimina con lejía y durante el proceso de tinción. La termofijación del esputo no tratado no matará a *M. tuberculosis*, mientras que la fijación con alcohol es bactericida.

- Cubrir la mancha:

La mancha se cubre con la solución de carbol fucsina (colorante básico primario).

- Calentar la mancha:

Esto se hace durante 5 minutos. Debe notar un desprendimiento de vapor (aproximadamente a 60 °C). Es importante no sobrecalentar y evitar quemar la muestra.

Con relación al calentamiento de la mancha, se debe tener mucho cuidado al calentar la carbol fucsina, especialmente si la tinción se lleva a cabo sobre una bandeja u otro recipiente en el que se hayan recogido productos químicos altamente inflamables de la tinción previa.

Solo se debe aplicar una pequeña llama debajo de los portaobjetos usando un hisopo encendido previamente humedecido con unas gotas de alcohol ácido, metanol o etanol al 70 %. Evitar usar un hisopo grande empapado en etanol porque esto es un riesgo de incendio.

- Lavar la mancha:

Este lavado debe hacerse con agua limpia. Si el agua del grifo no está limpia, lavar el frotis con agua filtrada o destilada, preferiblemente.

- Cubrir el frotis con alcohol ácido

Este alcohol ácido debe estar al 3 %. La cobertura se lleva a cabo durante 5 minutos o hasta que el frotis esté lo suficientemente decolorado, es decir, de color rosa pálido.

Hay que tomar en cuenta que el alcohol ácido es inflamable; por lo tanto, debe usarse con mucho cuidado. Se debe evitar estar cerca de fuentes de ignición.

- Lavar la mancha:

El lavado debe ser con agua limpia, destilada.

- Cubrir el frotis con colorante:

Puede ser colorante verde de malaquita (0,5 %) o azul de metileno (0,3 %) durante 1 o 2 minutos, utilizando el tiempo más prolongado si el frotis es delgado.

- Lavar la mancha:

Nuevamente debe utilizarse agua limpia (destilada).

- Drenar:

Se debe limpiar la parte posterior del portaobjeto y colocar la mancha en un estante de drenaje, para que esta se seque al aire (no usar papel absorbente para el secado).

- Examinar el frotis en el microscopio:

Debe usarse el objetivo de 100X y el aceite de inmersión. Escanear el frotis sistemáticamente y anotar las observaciones pertinentes.

- Interpretar los resultados:

Teóricamente, los microorganismos que se tiñan de un color rojizo se consideran ácido alcohol resistente positivos (AAR+).

Al contrario, si los microorganismos se tiñen de azul o verde, dependiendo del colorante utilizado como contra-colorante, se consideran ácido alcohol resistente negativos (AAR-).

TINCIÓN DE GIEMSA

¿Qué es la tinción de Giemsa?

La tinción de Giemsa es un tipo de coloración de muestras clínicas, basada en la mezcla de colorantes ácidos y básicos. Su creación estuvo inspirada por el trabajo realizado por Romanowsky, donde Gustav Giemsa, químico y bacteriólogo originario de Alemania, la perfeccionó agregando glicerol para estabilizar los compuestos.

La técnica de tinción de Giemsa es muy útil para estudios citológicos, ya que permite la observación de estructuras específicas de las células. Esta técnica tiñe los citoplasmas, núcleos, nucléolos, vacuolas y gránulos de las células, pudiéndose distinguir incluso finas trazas de cromatina.

Permite identificar células inmaduras en médula ósea y sangre periférica, siendo importante para el diagnóstico de enfermedades graves como la leucemia. También es posible detectar hemoparásitos, bacterias extra e intracelulares, hongos, entre otros.

En citogenética es bastante utilizada, ya que es posible estudiar la mitosis de las células.

Fundamento de la coloración de Giemsa:

Los colorantes tipo Romanowsky tienen como fundamento utilizar un contraste entre colorantes ácidos y básicos, para lograr teñir las estructuras básicas y ácidas respectivamente. Como se puede observar existe una afinidad de los colorantes ácidos a teñir las estructuras básicas y viceversa.

El colorante básico utilizado es el azul de metileno y sus derivados oxidados (Azure A y Azure B), mientras que el colorante ácido es la eosina.

Las estructuras ácidas de las células son los ácidos nucleicos, los gránulos de los segmentados basófilos, entre otras, por tanto, serán teñidos con el azul de metileno.

Materiales:

- Materiales para la preparación de la solución madre:

La preparación de la solución madre requiere pesar 600 mg de colorante Giemsa en polvo, medir 500 cc de alcohol metílico libre de acetona y 50 cc de glicerina neutra.

- Modo de preparación de la solución madre:

Colocar el polvo de Giemsa pesado en un mortero. Si existen grumos se deben pulverizar. Posteriormente agregar una cantidad apreciable de la glicerina medida y mezclar muy bien. La mezcla obtenida se vierte a un frasco color ámbar muy limpio.

El resto de la glicerina se coloca en el mortero. Volver a mezclar para limpiar el resto de colorante que haya quedado pegado a las paredes del mortero y echar al mismo frasco.

El frasco se tapa y se lleva durante 2 horas en baño maría a 55 °C. Mientras se encuentre en baño de maría, realizar ligeras agitaciones de la mezcla cada media hora aproximadamente.

Posteriormente, se deja enfriar la mezcla para colocar el alcohol. Previamente, una parte del alcohol medido se coloca en el mortero para terminar de lavar lo que quede de colorante y seguidamente se adiciona a la mezcla junto al resto del alcohol.

Esta preparación se debe dejar madurar durante al menos 2 semanas. La porción que se vaya utilizando de la solución madre debe ser filtrada.

Para evitar la contaminación del preparado, se recomienda pasar la porción que va a estar en constante uso a un frasco ámbar pequeño con gotero. Recargar cada vez que se agote el reactivo.

- Materiales para preparar la solución Buffer:

Por otra parte, se prepara una solución buffer a pH 7,2 de la siguiente manera:

Se pesan 6,77 gr de fosfato de sodio (anhidro) (NaHPO_4), 2,59 gr de fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4) y agua destilada hasta 1000 cc.

- Preparación final del colorante:

Para la preparación de la solución final de tinción se miden 2 cc de la solución madre filtrada y se mezclan con 6 cc de la solución buffer. Se agita la mezcla.

Un dato relevante que hay que tener en cuenta, es que las técnicas de preparación del colorante pueden cambiar según la casa comercial.

- Materiales adicionales necesarios para realizar la coloración:

A parte de los materiales descritos, se debe disponer de puentes de coloración, pisetas con agua o buffer para el lavado, láminas porta objetos o cubre objetos, un cronómetro para controlar los tiempos de coloración y papel secante o algún material que sirva para secar (gasa o algodón).

Técnica.

Proceso de tinción:

- 1) Previo a la coloración se debe tener listo el extendido de la muestra sobre un portaobjetos limpio.

Las muestras pueden ser sangre, médula ósea, cortes de tejidos histológicos o muestras cervico-vaginal. Se recomienda que los extendidos sean finos y tengan 1 o 2 horas de secado antes de colorearlos.

- 2) Sobre un puente de coloración se colocan todas las láminas que se tengan para colorear. Se trabaja siempre en un mismo orden y se identifica bien cada lámina.
- 3) Colocar unas gotas de alcohol metílico al 100% (metanol) sobre el frotis y dejar actuar por 3 a 5 minutos, con el fin de fijar y deshidratar la muestra.
- 4) Descartar el metanol presente en la lámina y dejar secar al aire.
- 5) Una vez seco colocar con un gotero la solución final de tinción hasta cubrir la totalidad de la lámina. Dejar actuar por 15 minutos. Algunos autores recomiendan hasta 25 min. Depende de la casa comercial.
- 6) Ecurrir el colorante y lavar el frotis con agua destilada o con solución buffer a 7,2.
- 7) Sobre un papel secante dejar secar las láminas al aire libre, dispuestas en forma vertical con ayuda de un soporte.
- 8) Limpiar el dorso del portaobjetos con una gasa o algodón humedecido en alcohol para eliminar cualquier resto de colorante.

Modo de almacenamiento:

Después de preparado el colorante debe mantenerse a temperatura ambiente (15 – 25°C), para evitar que el colorante precipite. Debe almacenarse en envase ámbar bien cerrado.

CONCLUSIÓN.

En este trabajo, se explicaron dos tipos de tenciones, ambas muy importantes para el área de salud, la tinción de Ziehl-Neelsen en una técnica de coloración para identificar microorganismos o microbacterias, es de gran ayuda.

Y la tinción de Giemsa es un tipo de coloración de muestras clínicas, basada en la mezcla de colorantes ácidos y básicos, es usada en varias ramas como: hematología, micología, bacteriología, parasitología, citología, citogenética.

Ambas tinciones tienen su gran aportación e importancia, al igual que cada una realiza una determinada función.

BIBLIOGRAFÍA

- Briceño, K. (2021, 19 febrero). *Tinción de Ziehl-Neelsen*. Lifeder. <https://www.lifeder.com/tincion-ziehl-neelsen/>
- Gil, M. (2019, 15 agosto). *Tinción de Giemsa: fundamento, materiales, técnica y usos*. Lifeder. <https://www.lifeder.com/tincion-de-giemsa/>