

Tema 2.- Tinciones Bacteriológicas

El contraste en una observación microscópica da cuenta de la diferencia de intensidad entre el objeto y el medio. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos son prácticamente transparentes, por lo cual el contraste es casi nulo.

La solución más rápida del problema es recurrir a técnicas de tinción, o sea aplicar compuestos coloreados que reaccionen con determinados componentes celulares: LOS COLORANTES. De ellos existen diferentes tipos según su naturaleza y su afinidad con las estructuras bacterianas.

En primer lugar estudiaremos la **técnica de tinción en general** y luego:

- Tinción simple.
- Tinción diferencial o doble: esta a su vez pueden ser:
 - Gram
 - Ziehl-Nielsen
- Tinción morfológica o estructural para ver: Flagelos, cápsulas y esporas.

Por último veremos el examen en fresco.

TÉCNICA GENERAL DE TINCIÓN

De forma general, los pasos a seguir son los siguientes:

1.- Extensión o preparación del frotis: Sobre un porta bien limpio y desengrasado, hacemos la extensión del producto a examinar.

a) Producto a examinar líquido o semilíquido: colocamos una pequeña cantidad de muestra con el asa de platino, previamente flameado, en el centro del porta y extendemos con movimientos circulares hasta que ocupe 1cm aproximadamente.

b) Producto sólido: con el asa se coloca previamente una gota de solución fisiológica salina o H₂O destilada y emulsionamos (mezclamos) en ella una pequeña cantidad del producto a examinar, extendiendo sobre la superficie del porta.

2.- Deseccación: se deja secar la extensión a Temperatura ambiente

3.- Fijación: la extensión se fija al porta mediante calor, que se consigue pasando el porta 2 o 3 veces por la llama del mechero, con la cara de la preparación hacia arriba. El objetivo de la fijación es adherir la preparación al porta y fijar la morfología bacteriana por coagulación rápida de las proteínas.

4.- Enfriar

5.- Coloración

6.- Lavado

7.- Secado

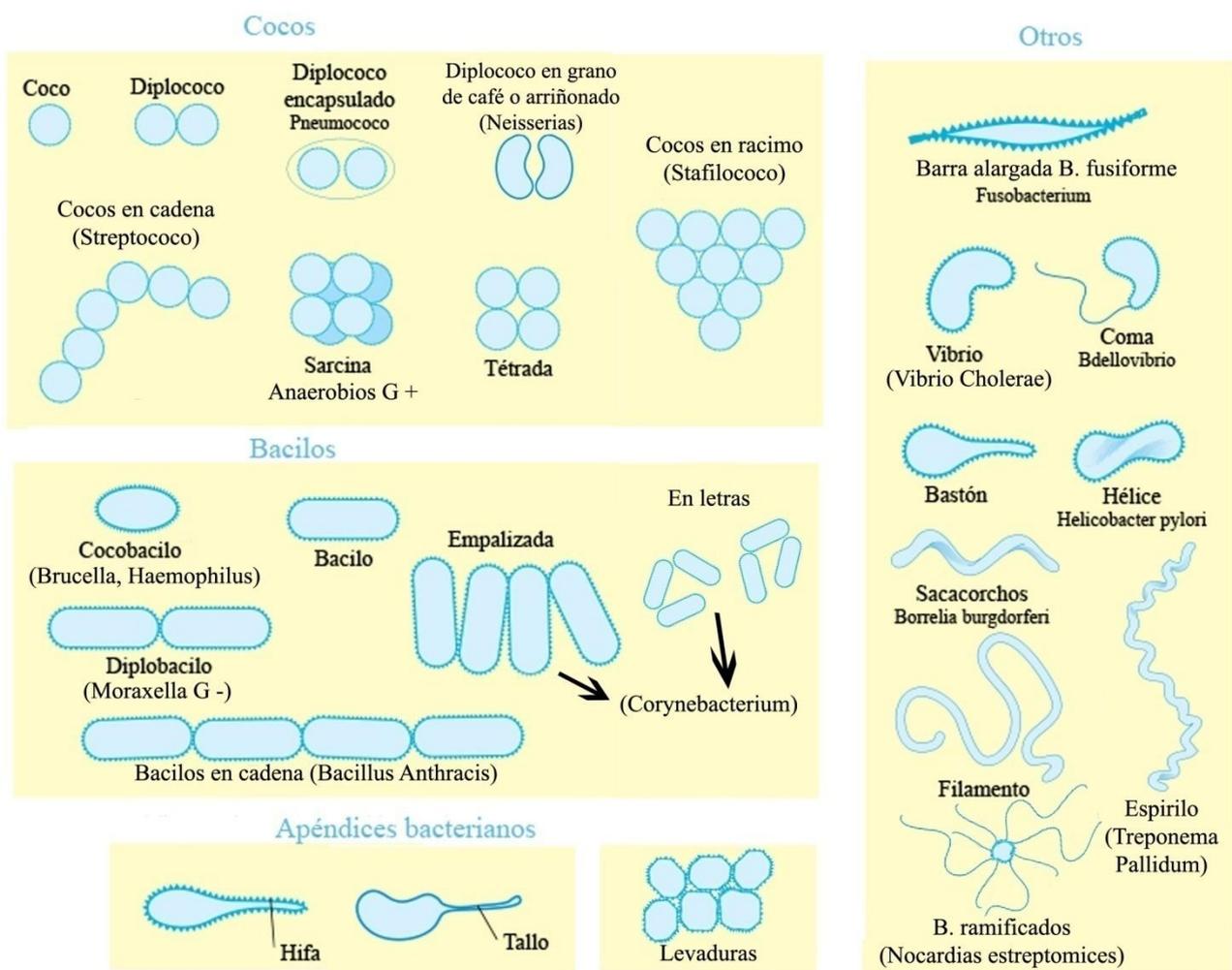
8.- Observación al microscopio

TINCIÓN SENCILLA o SIMPLE

Tiene como finalidad orientar sobre la morfología, cantidad, agrupación de las bacterias,...

Material: Portaobjetos, Asa de Platino, Mechero Bunsen, Cristalizador y paralelas o puente (La separación entre las dos varillas de vidrio utilizadas debe ser aproximadamente de la mitad de la longitud del porta), Colorantes, Aceite inmersión y Microscopio.

- Técnica:**
- 1.- Extensión, 2.- Deseccación, 3.- Fijación, 4.- Enfriar (como en la Tinción general).
 - 5.- Coloración. Con Azul de metileno, o Fucsina, cubriendo la preparación y dejando actuar 1 ó 2 minutos.
 - 6.- Lavado: con agua para arrastrar el exceso de colorante procurando que no caiga directamente en la preparación.
 - 7.- Secado a temperatura ambiente.
 - 8.- Observación al microscopio con objetivo de inmersión.



TINCIÓN DIFERENCIAL O DOBLE

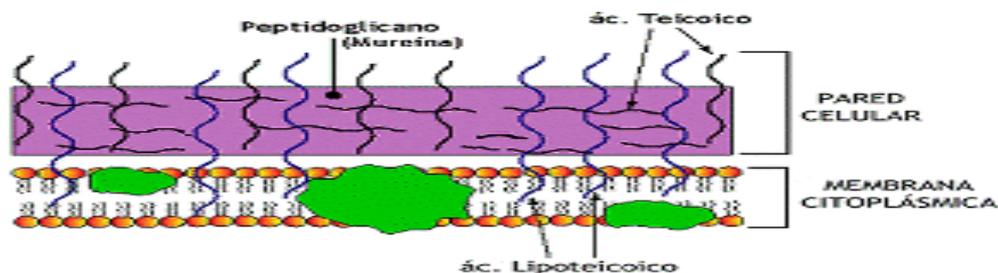
Se utilizan dos colorantes. Permite diferenciar grupos bacterianos, ayudando así a la clasificación taxonómica de los microorganismos. Vamos a ver la tinción de Gram y la de Ziehl-Nielsen.

TINCIÓN DE GRAM

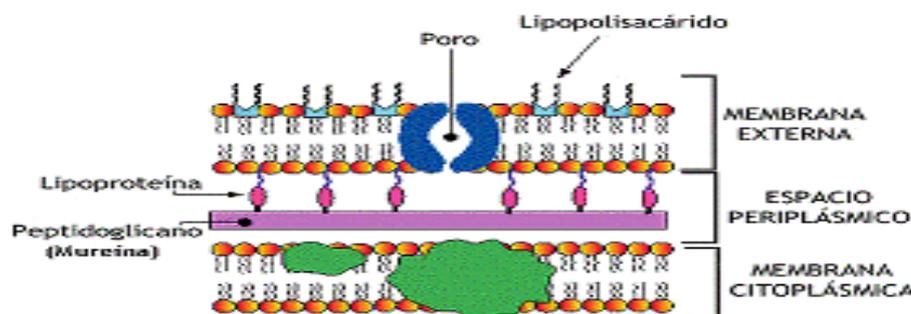
La desarrolla Christian Gram en el año 1883.

Fundamento: Permite establecer dos grandes grupos bacterianos: Gram positivos y Gram negativos. La diferencia entre ambos, reside en la estructura y composición química de la pared celular.

Gram positivos: Mureína (N-acetilglucosamina + N-acetil-murámico) y Ácidos Teicoicos



Gram negativos: Mureína (N-cetilglucosamina + N-acetil-murámico) y lípidos



Comportamiento de ambas Gram positivas y Gram negativas:

Las bacterias Gram positivas, al no contener prácticamente lípidos, al ser tratadas con alcohol, se deshidratan, los poros disminuyen y la permeabilidad también, reteniendo el colorante, complejo Cristal Violeta-Iodo, (complejo CV-I).

Las bacterias Gram negativas, por su alto contenido en lípidos, al ser tratadas con alcohol, éste los disuelve, aumentando la permeabilidad de la pared y perdiendo así el complejo CV-I.

Por lo tanto, después del tratamiento con el primer colorante y posterior decoloración, solo quedarán teñidas las bacterias Gram positivas.

Para poner de manifiesto la existencia de bacterias Gram negativas hace falta utilizar un segundo colorante llamado COLORANTE DE CONTRASTE.

Otros grupos bacterianos relacionados con el Gram

- GRAM NO REACTIVO Incluye microorganismos que no se tiñen o lo hacen con dificultad: mycobacterias, espiroquetas,....
- GRAM VARIABLE: En este grupo se encuentran bacterias del género Neisseria que se comportan como Gram positivo o negativo indistintamente

Técnica

- 1.- EXTENSION
- 2.- DESECACION
- 3.- FIJACION (calor)
- 4.- ENFRIAR
- 5.- 1º COLORANTE: Cubrir la preparación con Cristal violeta (1 min) o con Violeta de Genciana (3 min).

6.- LAVAR: Para escurrir el exceso de colorante lavamos con agua corriente.

7.- CUBRIR CON LUGOL durante 1 min., actúa como mordiente, es decir refuerza la unión microorganismo-colorante y al tiempo lo hace más refringente.

8.- ESCURRIR Y LAVAR

9.- DECOLORAR con alcohol-acetona (al 30 % v/v) o con alcohol 96º. Es difícil dar normas fijas sobre la intensidad con que se debe efectuar la decoloración. Sólo la práctica va dando la experiencia de cómo realizarla, a título orientativo, se recomienda añadir el decolorante gota a gota y dejar actuar hasta que arrastre líquido claro.

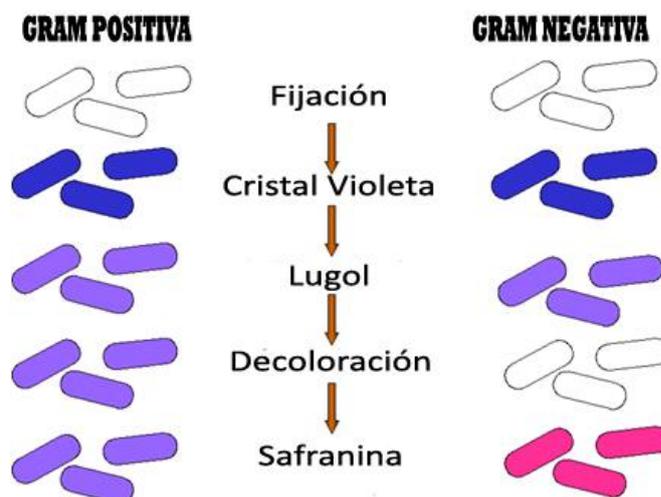
10.- LAVAR para cortar la decoloración con abundante agua.

11.-COLORANTE DE CONTRASTE o 2º contraste se utiliza Safranina durante 3 minutos (teñirá las bacterias Gram -).

12.-LAVAR

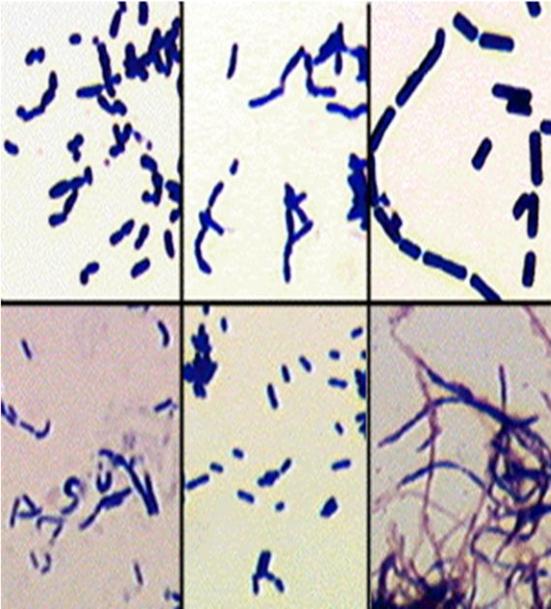
13.-SECAR: a temperatura ambiente.

14.-OBSERVACION CON OBJETIVO DE INMERSION

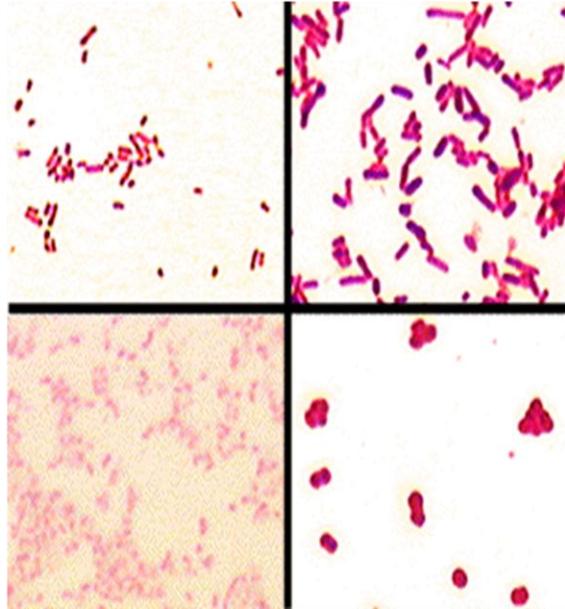


Interpretación de la observación	
Formas redondeadas COCOS	Violeta-púrpura. Cocos Gram positivos
	Rosa-rojizo. Cocos Gram negativos
Formas alargadas BACILOS	Violeta. Bacilos Gram positivos
	Rojo. Bacilos Gram negativos

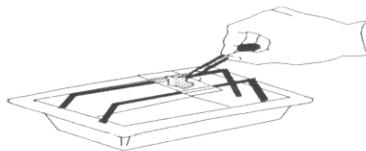
GRAM POSITIVAS



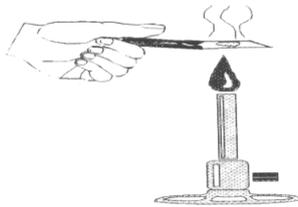
GRAM NEGATIVAS



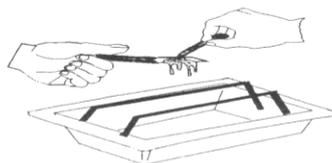
En este esquema hay algunas variaciones como el primer colorante y el calentamiento posterior.



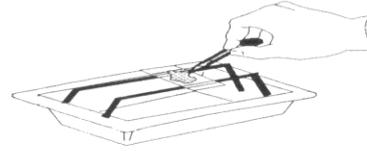
1. VERDE MALAQUITA



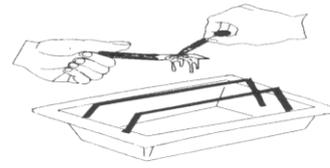
2. CALENTAR (5 min)



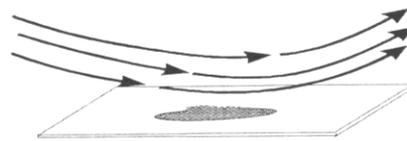
3. LAVAR



4. SAFRANINA (1 min)



5. LAVAR



6. SECAR

Diferencias entre Gram (+) y Gram (-) en cada proceso de la técnica

	GRAM (+)	GRAM (-)
CRISTAL VIOLETA	Se tiñe en violeta	Se tiñe en violeta
LUGOL (YODO-YODURADO)	Se forma el complejo cristal-violeta-yodo dentro de las bacterias, y las bacterias permanecen violeta	Igual que en las Gram+
ALCOHOL ACETONA	Las paredes celulares se deshidratan, hay retracción en los poros, la permeabilidad disminuye, el complejo cristal-violeta-yodo no puede salir de la bacteria y permanecen violetas.	Se produce extracción de lípidos de las paredes celulares, aumento de los poros y el complejo cristal-violeta-yodo sale de la bacteria.
SAFRANINA	Las bacterias no afectadas permanecen violetas	Las bacterias toman este colorante y se tiñen de rojo

La tinción de Gram tiene su principal aplicación en la caracterización de las bacterias, pero las levaduras, teñidas por esta técnica son Gram (-), sin embargo la tinción no es aplicable a otros microorganismos como protozoos y hongos que no sean levaduras.

Tinción de Ziehl-Nielsen o Ácido Alcohol Resistente

Fundamento:

Algunas bacterias poseen en su pared lípidos complejos (ceras), que dificultan la penetración del colorante, y, además, ácidos grasos de cadena larga que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol ácido.

Si forzamos la coloración con calor, llegan a teñirse, e incluso resisten la posterior decoloración con alcohol-ácido. De ahí la denominación de ácido alcohol resistentes (BAAR).

Son muy pocos los microorganismos que poseen esta característica. Entre los más importantes se encuentran las Mycobacterias y las Nocardias.

Técnica:

1.- EXTENSIÓN, generalmente se trata de una muestra de esputo, esta se toma directamente, se extiende de forma muy amplia para que ocupe la mayor superficie del porta.

2.- DESECACIÓN

3.- FIJACIÓN

4.- ENFRIAR

5.- COLORACIÓN. Se coloca sobre la extensión un trozo de papel de filtro y se cubre con Fucsina de Ziehl, dejándola actuar 1 minuto en frío. Y luego calentar hasta la emisión de vapores 4-5 min. Lo que se consigue colocando la extensión sobre la platina de Malassez, o bien aplicando debajo del porta una torunda de algodón empapada en alcohol ardiendo. **IMPORTANTE:** No debe de hervir el colorante ni que llegue a secarse. Una modificación bastante cómoda y perfectamente fiable consiste en sustituir la fucsina de Ziehl y el calentamiento por Fucsina tensioactiva que fuerza la penetración del colorante sin necesidad de calor.

6.- ENFRIAR 3 minutos, quitar el papel de filtro y lavar con abundante agua.

7.- DECOLORACION. Con alcohol-clorhídrico (3% v/v), gota a gota hasta eliminar el colorante.

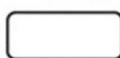
8.- COLORANTE DE CONTRASTE (2º colorante). Azul de Metileno durante 2 minutos, también se puede emplear verde de Malaquita.

9.- LAVAR con agua

10.-SECAR a temperatura ambiente.

11.-OBSERVAR. Con objetivo de inmersión

BAAR



Pasos

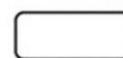
Fijación

Colorante principal:
fucsina

Decoloración:
alcohol/HCl

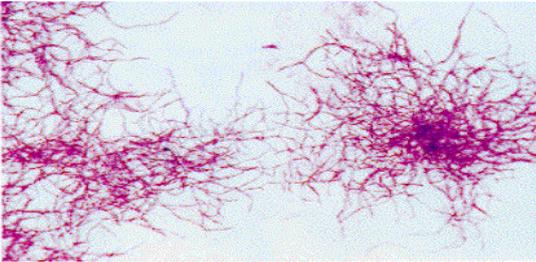
Colorante de contraste:
Azul de metileno

NO BAAR

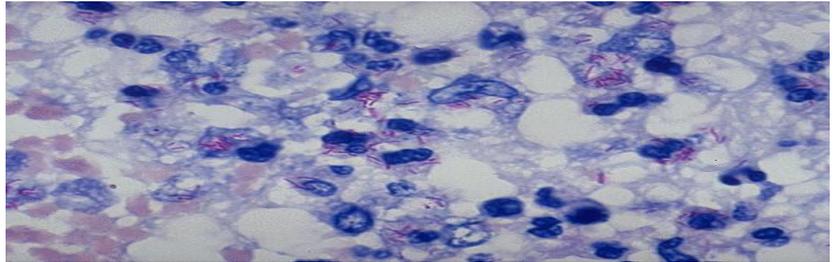


Interpretación de la observación	
Bacilos de color rojo brillante, Z-N (+): BAAR	Bacilos de color azul, Z-N (-): no BAAR

NOCARDIAS



MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS



Variante de la Tinción de Ziehl-Nielsen, coloración de Tan-Thiam-Hok

Es más rápida y evita el calentamiento.

Técnica:

- 1.- EXTENSIÓN
- 2.- DESECACIÓN
- 3.- FIJACIÓN
- 4.- COLORACIÓN. Colorante de Kinyoun 3 minutos
- 5.- LAVADO
- 6.- SOLUCION DE GABETT 1 minuto
- 7.- LAVADO
- 8.- SECADO
- 9.- OBSERVACIÓN. Los bacilos BAAR se observan de color rosado

TINCIONES ESTRUCTURALES

Flagelos

Los flagelos son estructuras a modo de apéndices largos, filamentosos, que presentan la mayoría de las bacterias móviles, si bien todas las que son móviles no lo son por flagelos.

Sus dimensiones son tan pequeñas que se hallan normalmente fuera del poder de resolución del microscopio óptico.

Por ello y porque se retraen muy fácilmente, adhiriéndose a la pared celular son muy difíciles de teñir y de ver, y solo se usan estas coloraciones en situaciones especiales.

Existen numerosos métodos para su tinción, entre los que se encuentran: el método de Rhodes, de Tribondeau, de Leifson, etc....

Método de Leifson

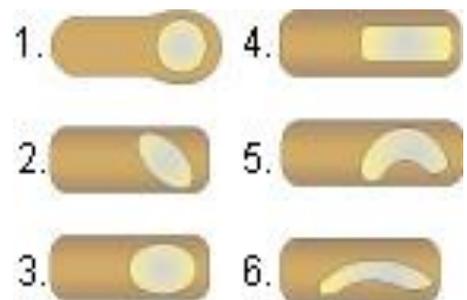
- 1.- EXTENSIÓN
- 2.- DESECACIÓN
- 3.- NO HAY FIJACIÓN
- 4.- COLORANTE DE LEIFSON 10 minutos.
- 5.- LAVAR
- 6.- SECAR
- 7.-OBSERVAR con objetivo de inmersión. Los flagelos se observan rojo oscuro o púrpura.

Esporas

Las esporas son las formas de resistencia de las bacterias. Según su localización en la célula se distinguen varios tipos:

Las más frecuentes son las centrales, las subterminales o las terminales. Son características las imágenes en “palillo de tambor”.

Los dos métodos más importantes son el de Moeller y el de Wirtz –Conklin.



Método de Wirtz –Conklin.

- 1.- EXTENSIÓN
- 2.- DESECACIÓN
- 3.- FIJACIÓN
- 4.- COLORACIÓN: Verde de Malaquita 1 min. en frío y 4-6 min. de calor hasta emisión de vapores

5.-ENFRIAR

6.-LAVADO. Solo quedan teñidas las esporas; para visualizar las formas vegetativas se emplea el colorante de contraste.

7.-COLORANTE DE CONTRASTE: Safranina 1 min.

8.- LAVAR

9.- SECAR

10.- OBSERVAR. Las formas vegetativas se teñirán de rojo y las esporas de verde.

Cápsulas

Suelen estar compuestas de mucopolisacáridos o polipéptidos y por su alto contenido en agua se tiñen débilmente por los colorantes, por ello se utilizan técnicas negativas, que tiñen el fondo de la preparación, destacando sobre él, las cápsulas sin teñir.

Los dos métodos más importantes son el de Hiss o Anthony y el de la tinta china

Método de Hiss o Anthony

1.- EXTENSIÓN

2.- DESECACIÓN

3.- NO FIJACIÓN (naturaleza proteica de la cápsula)

4.- COLORACIÓN: Cristal Violeta 2 min.

5.- LAVADO CON SULFATO DE COBRE TEMPLADO (aumenta la refringencia de la cápsula)

6.- OBSERVACIÓN

Método de la tinta china

1.-EXTENSIÓN

2.- DESECACIÓN

3.- NO FIJACIÓN

4.- COLORACIÓN CON FUCSINA 2 min.

5.- LAVADO

6.- NIGROSINA O TINTA CHINA POR EL MÉTODO DE LOS DOS PORTAS

7.- SECADO

8.- OBSERVAR. Se observará el fondo negro, las bacterias rojas y la cápsula será un halo blanco que las envuelve.

EXAMEN DE LOS MICROORGANISMOS VIVOS

Se llama también **Observación vital** y se utiliza para la investigación de la morfología y sobre todo la movilidad microbiana. Los métodos más empleados son:

→Examen en fresco:

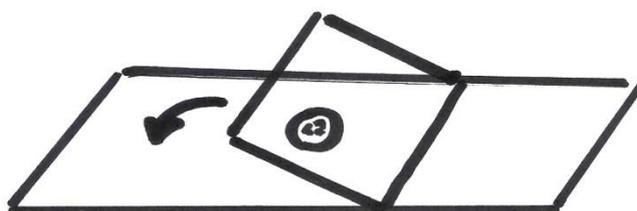
- preparaciones húmedas
- gota pendiente

→Coloraciones vitales.

EXAMEN EN FRESCO

Preparaciones húmedas, examen directo entre porta y cubre:

Si estamos ante un líquido: Se coloca una gota del líquido que contiene los microorganismos sobre un porta limpio y seco, sobre el que se coloca un cubre. Pueden cubrirse los bordes con parafina para disminuir la evaporación.

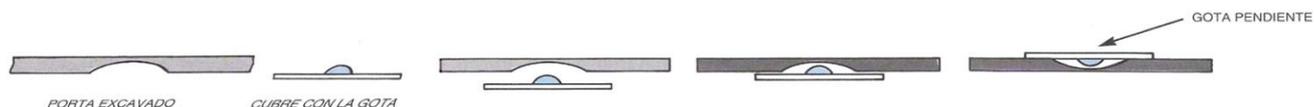


Si se parte de un producto sólido, se deposita primero una gota de agua estéril o solución salina estéril sobre el porta, para posteriormente, con la ayuda del asa, realizar una suspensión del producto. Se observa con objetivo seco de 10X o 40X, sirviendo como referencia los bordes del propio cubre.



Método de la gota pendiente

Técnica: Se utilizan unos portas especiales con una o varias excavaciones (célula de Koch). Con un asa de platino previamente esterilizada, se coloca una gota de la suspensión en el centro de un cubre seco y limpio. Se coloca el porta sobre el cubre de manera que la gota coincida con el centro de la excavación. Se da la vuelta al porta manteniendo el cubre en su posición. Se observa con objetivo seco de 10X ó 40X.



COLORACIONES VITALES

Son tinciones de materia viva. Se suelen utilizar como colorantes el azul de metileno o el verde de malaquita y su objetivo es facilitar la observación sin provocar alteraciones celulares ni destruir la bacteria. Basta colocar sobre el porta una gota del material a examinar y al lado otra del colorante, y mezclarlas con el asa de platino. Se observa con objetivo de inmersión. Prácticamente no se utilizan en Bacteriología.