



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

"Manual de Tinciones"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

VICTOR ALDO VELÁZQUEZ CAMPOS

ASESORES DE TESIS

M. en C. PAOLA EDITH BRISEÑO LUGO

QFB. JOSÉ ARTURO MARTÍN TERESO



**UNAM
CUAUTITLÁN**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

El siguiente trabajo se lo dedico a mis padres, hermanos, sobrinos, amigos, profesores, asesores de tesis y a todas y cada una de las personas que me acompañaron durante todo este trayecto.

A ti, que estas leyendo esto, espero que nuestro trabajo te sea de muchísima ayuda.

Agradecimientos

Me es muy grato y sumamente especial estar escribiendo estas palabras en este momento de mi vida, ha sido un camino de incontables luchas y momentos de desesperación, en los cuales creí que esto no sería posible y hoy, aquí estoy, agradeciendo la oportunidad a todos y cada uno de los que me apoyaron a lo largo del camino.

Quiero comenzar agradeciendo a mi madre, la persona que me dio la vida, ya que sin su apoyo y amor incondicional no estaría aquí en este momento, muchísimas gracias por enseñarme a luchar por mis sueños, a salir adelante, a ser perseverante y sobretodo a defender mis ideales siempre, muchas gracias.

A mi padre que, aunque no está presente físicamente, lo llevo en mi alma y corazón, tu legado, sabiduría y enseñanzas los llevaré conmigo siempre.

A mis hermanos Abraham, Emma, Ana. Gracias por ser un ejemplo de lucha y de vida, gracias por enseñarme que puedo lograr todo lo que me proponga y que no hay sueños pequeños ni imposibles de lograr. No hay palabras para describir el respeto y admiración que les tengo a todos y cada uno de ustedes, gracias.

A mis sobrinos, María y Santiago, quiero que sepan que pueden lograr todo lo que se propongan siempre y cuando se esfuercen por ello, le agradezco a la vida que me permita verlos crecer en todos los aspectos, muchas gracias por enseñarme que nunca debemos olvidar sorprendernos, ser curiosos y querer aprender todo lo que se pueda, los amo con todo mi ser, gracias por llegar a mi vida.

Francisco, muchísimas gracias por todo el apoyo que me brindaste día con día durante toda esta etapa. Eres parte fundamental en la realización de este sueño. Gracias.

A todas y cada una de las personas que estuvieron apoyándome durante todo el trayecto escolar, sin sus consejos, regaños y apoyo incondicional esto no sería una realidad:

Alejandra, muchísimas gracias por todos los momentos tan hermosos que vivimos juntos durante la etapa universitaria, eres un ejemplo a seguir, tu constancia y entereza te llevarán muy lejos. Te quiero.

Javier, gracias por todos los momentos que vivimos juntos como alumnos, tanto como representantes de carrera, son cosas que me llevaré en la memoria hasta el último día de mi vida.

Amigos, que más que amigos son familia: Itzel, Diego, Oscar, Diana, Selene, Bianca, Vanessa, Josa, Salvador, Edwin, Lizette, Jesús, Augusto, Junuen, Samuel, Obed, Axel, muchas gracias por todos los gratos momentos que hemos vivido.

A todas y cada una de las personas que me acompañaron a lo largo de este trayecto, muchísimas gracias.

A mis profesores, a todos y cada uno de ustedes, les agradezco de todo corazón que me hayan formado como profesional de una manera increíble. Sin ustedes no estaría aquí. Muchísimas gracias.

A mis asesores de tesis: Paola y Arturo, muchísimas gracias por todo el tiempo y el empeño puesto en este trabajo, sin ustedes, esto no sería una realidad. Estaré agradecido toda la vida por todos los consejos y apoyo que me brindaron durante la realización de este trabajo. Muchísimas gracias.

Y, por último, pero no menos importantes, agradezco a la vida, al destino, al universo y a todas las cosas en las que creo, el hecho de permitirme estar concluyendo una de las etapas más importantes en mi vida, gracias por ayudarme y enseñarme que, si lo deseas con el corazón, todo es posible.

“El universo siempre conspira”.

ÍNDICE

1	RESUMEN	5
2	JUSTIFICACIÓN	6
3	OBJETIVOS	8
3.1	General	8
3.2	Particulares	8
4	INTRODUCCIÓN	9
5	TINCIÓN DE GRAM	21
6	TINCIÓN ZIEHL-NEELSEN	28
7	CRISTAL VIOLETA	35
8	ROJO CONGO	39
9	TINCIÓN FLAGELAR	44
10	TINCIÓN DE ESPORAS (WIRTZ-CONKLIN O SHAFFER FULTON)	50
11	TINCIÓN AZUL DE ALGODÓN	55
12	TINCIÓN NEGATIVA	60
13	TINCIÓN CON LUGOL	65
14	TINCIÓN DE KINYOUN	69
15	TINCIÓN DE WRIGHT	74
16	TINCIÓN DE GIEMSA	80
17	TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA	85
18	TINCIÓN DE EOSINÓFILOS	92
19	TINCIÓN DE RETICULOCITOS	98

20	TINCIÓN DE MIELOPEROXIDASA	103
21	TINCIÓN DE PAPANICOLAOU	109
22	TINCIÓN DE PERLS	116
23	TINCIÓN DE SCHIFF	121
24	ANÁLISIS DE RESULTADOS	126
25	PROYECCIONES.....	127
26	CONCLUSIONES.....	128
27	REFERENCIAS.....	129
28	HOJAS DE SEGURIDAD	132

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Información general del manejo integral de residuos.....	27
Tabla 2.	Evaluación y reporte de laminillas teñidas por Ziehl-Neelsen	30
Tabla 3.	Información general del manejo integral de residuos.....	34
Tabla 4.	Diferentes usos del colorante cristal violeta	37
Tabla 5.	Información general del manejo integral de residuos.....	38
Tabla 6.	Información general del manejo integral de residuos.....	43
Tabla 7.	Información general del manejo integral de residuos.....	49
Tabla 8.	Información general del manejo integral de residuos.....	54
Tabla 9.	Información general del manejo integral de residuos.....	59
Tabla 10.	Información general del manejo integral de residuos.....	64
Tabla 11.	Diferentes aplicaciones del Lugol.....	65
Tabla 12.	Información general del manejo integral de residuos.....	68
Tabla 13.	Información general del manejo integral de residuos.....	73
Tabla 14.	Información general del manejo integral de residuos.....	79
Tabla 15.	Información general del manejo integral de residuos.....	84
Tabla 16.	Información general del manejo integral de residuos.....	90

Tabla 17. Información general del manejo integral de residuos.....	97
Tabla 18. Información general del manejo integral de residuos.....	101
Tabla 19. Información general del manejo integral de residuos.....	108
Tabla 20. Información general del manejo integral de residuos.....	114
Tabla 21. Información general del manejo integral de residuos.....	120
Tabla 22. Información general del manejo integral de residuos.....	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del espectro electromagnético.....	16
Figura 2. Diferencias estructurales entre bacterias Gram (+) y (-).....	22
Figura 3. Visualización de bacterias Gram (+) y (-)	24
Figura 4. Esquema de la pared celular de las micobacterias.....	29
Figura 5. Mycobacterium tuberculosis observada al microscopio.....	30
Figura 6. Mycobacterium tuberculosis observada al microscopio.....	31
Figura 7. Estructura molecular de triamino-trifenilmetano	36
Figura 8. Muestra tratada con tinción rojo congo	40
Figura 9. Esporangios y esporas teñidas con rojo congo.....	40
Figura 10. Muestra histológica teñida con rojo congo	41
Figura 11. Esquema de un filamento bacteriano.....	44
Figura 12. Muestra con tinción flagelar al microscopio	45
Figura 13. Flagelos observados al microscopio	46
Figura 14. Muestra teñida con tinción de Wirtz-Conklin.....	51
Figura 15. Muestra teñida con tinción de Wirtz-Conklin.....	51
Figura 16. Tinción de endosporas	52
Figura 17. Aspergillus spp con tinción azul de algodón	56
Figura 18. Aspergillus flavus con tinción azul de algodón	57
Figura 19. Cryptococcus neoformans observado al microscopio.....	62
Figura 20. Cápsulas de levaduras observadas al microscopio	62
Figura 21. Quiste teñido con Lugol	66
Figura 22. Levaduras teñidas con Lugol.....	67
Figura 23. Muestra teñida con la técnica de Kinyoun.....	70
Figura 24. Cyclospora cayetanensis teñida con Kinyoun	71

Figura 25.	Trofozoítos teñidos con tinción de Wright	75
Figura 26.	Glóbulos blancos teñidos con tinción de Wright.....	76
Figura 27.	Frotis sanguíneo teñido con la técnica de Giemsa.....	81
Figura 28.	Células sanguíneas teñidas con la técnica de Giemsa.....	82
Figura 29.	Epitelio cilíndrico ciliado teñido con H-E.....	86
Figura 30.	Secciones de parafina teñidas con H-E	87
Figura 31.	Muestra teñida con May Grünwald-Giemsa	93
Figura 32.	Muestra sanguínea teñida con May Grünwald-Giemsa	94
Figura 33.	Recuento de reticulocitos observado al microscopio	98
Figura 34.	Muestra de sangre teñida con azul de cresil brillante	99
Figura 35.	Esquema de la reacción de mieloperoxidasa	104
Figura 36.	Muestra teñida con la técnica de mieloperoxidasa.....	104
Figura 37.	Muestra teñida con la técnica de mieloperoxidasa.....	105
Figura 38.	Citología cervical teñida con la técnica de Papanicolaou	110
Figura 39.	Muestra teñida con la técnica de Papanicolaou.....	112
Figura 40.	Muestra de médula ósea teñida con la técnica de Perls.....	117
Figura 41.	Muestra teñida con la técnica de Perls	118
Figura 42.	Muestra histológica teñida con la técnica de Schiff	121
Figura 43.	Cepillado esofágico tratado con la técnica de PAS	122
Figura 44.	Muestra teñida con la técnica de PAS.....	123

1 RESUMEN

El presente manual de tinciones tiene como objetivo fomentar el aprendizaje no sólo de estudiantes, sino también de profesores, laboratoristas y personal encargado de la recolección de los residuos generados en los laboratorios de las diversas materias impartidas en la FES Cuautitlán (FES-C).

La selección de las tinciones mencionadas en el trabajo, fue realizada con base en la frecuencia en la que son utilizadas en los diferentes laboratorios de la FES-C, así como en los diferentes paquetes terminales que se imparten en la carrera de Bioquímica Diagnóstica. Dentro de dicha selección se descartaron varias tinciones, ya que muchas de ellas son básicas y se repiten en muchas de las diferentes asignaturas que son parte de la carrera.

La organización del manual va desde la microbiología general hasta llegar a un enfoque más específico dependiendo de las técnicas utilizadas en los diferentes laboratorios. Todas las tinciones contienen una pequeña introducción, así como el fundamento de la técnica usada, el procedimiento y el respectivo tratamiento o manejo de los residuos que cada una de ellas genera, con el fin de facilitar el aprendizaje, la realización de la técnica y el manejo integral de los residuos.

El manual contiene información resumida y detalla de cada una de las tinciones utilizadas con mayor frecuencia en la FES Cuautitlán (FES-C), con el fin de servir como apoyo para todas y cada una de las personas mencionadas, facilitando así el aprendizaje de los estudiantes y fomentando el manejo integral de residuos idóneo para todos y cada uno de los componentes que son utilizados en las tinciones que se presentan en este trabajo.

2 JUSTIFICACIÓN

Actualmente existen requisitos y procedimientos que están establecidos por Normas Oficiales y en las cuales la FES-C se apoya para dar un adecuado manejo tanto a instalaciones, personal y residuos, algunas de estas normas son: NOM-083-SEMARNAT-2003, NOM-087-ECOL-1995, NOM-005-STPS-1998, NOM-054-SEMARNAT-1993 y NOM-018-STPS-2015, entre otras, y de las cuales destacaremos lo más importante y de relevancia en el presente trabajo.

Se deben de llevar a cabo al pie de la letra, ya sea en laboratorios de enseñanza, industrias farmacéuticas, hospitales, etc. para poder realizar un manejo integral de residuos adecuado y así generar la menor cantidad de residuos tóxicos o dañinos para el medio ambiente.

El manual de tinciones tiene como finalidad recabar en un solo documento la información de la mayoría de las técnicas que son utilizadas en los laboratorios de la FES-C, ya que las técnicas se encuentran dispersas en diferentes fuentes de información, por lo cual, la realización de este manual, es de gran ayuda para que el trabajo de los estudiantes, profesores y personal encargado de la recolección de residuos sea más sencillo.

Con el crecimiento y desarrollo demográfico, la modificación de las actividades productivas y el incremento en la demanda de los servicios, se ha rebasado la capacidad del ambiente para almacenar la cantidad de residuos que genera la sociedad; por lo que es necesario contar con sistemas de manejo integral de residuos adecuados con la realidad y necesidades de cada localidad. Para ello es necesario fomentar e implementar la recolección y tratamiento de la mayoría de los residuos generados en la Facultad de una forma correcta. La elaboración del manual de tinciones será de gran utilidad no sólo para los alumnos de las diferentes carreras impartidas en la Facultad, sino para los laboratoristas, profesores y personal encargado de la recolección de dichos residuos.

El manejo integral de residuos, hecho de manera correcta, fomenta el cuidado del medio ambiente, permitiendo así que en los laboratorios de la FES-C, dicha generación de residuos sea mínima y el medio ambiente no se vea perjudicado al realizar cualquiera de las técnicas mencionadas en el presente trabajo.

3 OBJETIVOS

3.1 General

Elaborar un manual actualizado y completo sobre las principales tinciones que se llevan a cabo en las diversas carreras de la FES-C, mediante la recopilación, organización y resumen de la información, que incluya los procedimientos de la eliminación y el manejo integral de los residuos que genera la realización de cada una de las tinciones mencionadas, para facilitar el aprendizaje por parte de los estudiantes, las actividades de los laboratoristas y del personal encargado de la recolección de residuos químicos en la FES-C.

3.2 Particulares

- Resumir la información de las tinciones más utilizadas en los laboratorios de las diferentes asignaturas de la FES-C, mediante una investigación bibliográfica de las mismas para facilitar el trabajo tanto de estudiantes como de laboratoristas.
- Establecer los lineamientos del manejo integral y control de los residuos generados por las tinciones utilizadas en los laboratorios de la FES-C, por medio de diagramas ecológicos para apoyar en el manejo integral de los residuos generados durante la realización de cada una de las técnicas y así generar la menor cantidad posible de residuos.

4 INTRODUCCIÓN

La microbiología al igual que todas las demás ciencias, se apoya de otras ciencias como lo son: Biología, Química, Bioquímica, Fisiología, Anatomía, Genética, Historia, entre muchas otras. Logrando así el enfoque que tiene y preserva hasta hoy en día. La microbiología nos permite estudiar a los microorganismos como lo son: bacterias, hongos, virus, virones, priones, parásitos y muchos otros más. Los pilares fundamentales de esta ciencia tan importante para nuestra vida están formados por la técnica y la especulación filosófica. Sin las observaciones detalladas que datan de los tiempos del neolítico; la ciencia en la cual se enfoca este manual no sería más que un conjunto de palabras sin sentido y carecerían de un significado latente; sin las formulaciones de las hipótesis del segundo, nuestra ciencia llamada microbiología no sería más que un conjunto de descripciones y fórmulas carentes de razón o enfoque.

Collard (1985) manifiesta lo siguiente:

Las reacciones de fermentación y de conservación de alimentos han tenido un gran desarrollo durante milenios, ya que hay registros que datan del uso de estas reacciones desde la época de los egipcios. Tan es así que en los antiguos papiros egipcios se hallan instrucciones detalladas de como elaborar vino o cerveza. Existen evidencias de que también se utilizaban otros procesos microbiológicos como el enriado del lino, que es muy antiguo y se cree que data de hace unos tres o cuatro mil años, teniendo un nivel técnico bastante avanzado.

La utilización de microorganismos para la elaboración de diversos productos lácteos, muy probablemente se dio en los tiempos del neolítico, época en la que surgió una revolución en diferentes aspectos, ya que el hombre comenzó a domesticar a algunos animales y con ello surgió la oportunidad de mantenerlos en rebaños, así como también se produjo la conservación de los alimentos utilizando métodos como el secado salado y deshidratación por inmersión en soluciones de azúcar. (p. 1)

Tal vez las técnicas bien definidas con las que contamos hoy en día en el área de la microbiología se fueron introduciendo desde hace muchos miles de años, pero las explicaciones a dichos procesos, reacciones y situaciones, carecían de una explicación lógica y coherente.

Si bien los procesos de fermentación, putrefacción y de algunas infecciones eran bien conocidos en esos tiempos, las explicaciones que se tenían para dichos procesos no eran del todo satisfactorias.

De acuerdo con algunos autores, podría decirse que la microbiología cuenta con cuatro eras:

- 1.- La era de la especulación (año 5000 a. C. – 1675)
- 2.- La era de la observación (1675 – hasta la mitad del siglo XIX)
- 3.- La era del cultivo (mediados del siglo XIX hasta principios del siglo XX)
- 4.- La era del estudio fisiológico y la biología molecular (principios del siglo XX – presente).

Collard (1985) menciona que:

Durante el desarrollo de la larga era de la especulación, diferentes pensadores desarrollaron la o las hipótesis de que las enfermedades en ese entonces conocidas, podían deberse al crecimiento de pequeños seres vivos, pero debido a la carencia de los microscopios no les era posible comprobar o corroborar dichas hipótesis. Uno de los pensadores de esa época fue Cicerón, quien formuló la posibilidad de que algunas fiebres podrían ser provocadas por la multiplicación de “pequeños animales”, y pasados 1500 años, Fracastorius escribió acerca de un <<*contagium vivum*>>, en el cual describía cual era la causa de algunas enfermedades infecciosas como la peste, la sífilis, la tuberculosis o el tifus. (p. 2)

La era de la observación se inicia con Anthony van Leeuwenhoek, gracias a que desarrolló un microscopio con el cual se podían observar bacterias y

algunas de las estructuras que las componen y que sin duda alguna fue el primero que vio y describió estos microorganismos. Los dibujos de Leeuwenhoek son de tal claridad que es fácil reconocer bacilos, estreptococos y otras formas características. Esta era continuó por un periodo aproximado de doscientos años, aunque no se produjo ningún avance significativo en el conocimiento por la función desempeñada por tales microorganismos, ya que no se contaba con los avances tecnológicos ni los conocimientos claros de como es que estos organismos interactuaban con el medio ambiente, así como con los seres humanos. (p. 3)

Collard (1985) también menciona que:

La era del cultivo fue iniciada gracias a Louis Pasteur a la par con Robert Koch quienes con sus respectivos experimentos y teorías dieron pie a lo que hoy en día es la microbiología moderna. Ambos se dedicaron a estudiar la naturaleza de la reacción de fermentación. La hipótesis de Pasteur era que cada reacción de fermentación estaba dada por el crecimiento y el metabolismo de un microorganismo en específico, lo que lo llevó a desarrollar métodos de cultivo de cada microorganismo con el fin de obtener cepas completamente aisladas, evitando así la contaminación con cualquier otro tipo de especie de microorganismo. Para poder llevar a cabo todos y cada uno de sus experimentos y ensayos, Pasteur se dedicó a utilizar formas para esterilizar los medios y el material de vidrio. El uso de la llama, el horno de aire caliente y la autoclave se iniciaron en el laboratorio de Pasteur, así como el uso de materiales de cuello de cisne sellados, con el fin de obtener materiales completamente estériles y funcionales para sus experimentos. Su trabajo sobre la fermentación, le llevó a la publicación de sus estudios sobre las alteraciones del vino y de la cerveza. Después de dichos estudios, Pasteur fue requerido para dar solución a la problemática que tenían con los gusanos de seda, pues estos organismos se morían en grandes cantidades, sin causa aparente. Pasteur estudió a los gusanos de seda llegando a la conclusión de que la causa de muerte de los mismos,

estaba dada por un parásito protozoo y, mediante el uso del microscopio, pudo comprobar la presencia de dicho parásito en los gusanos enfermos, así como la total ausencia de los mismos en los gusanos sanos. (p. 3)

Los trabajos que realizó sobre el ántrax y el cólera aviar dieron pauta a que se introdujera el concepto de atenuación de los cultivos y esto contribuyó de manera significativa al desarrollo de vacunas vivas con el fin de poder controlar ambas enfermedades y con el estudio de la rabia tuvo la oportunidad de producir una vacuna atenuada.

Robert Koch se hizo famoso por descubrir el bacilo causante de la tuberculosis, así como también el bacilo del cólera y sobretodo por el desarrollo de los postulados de Koch. El trabajo de Koch consistió en aislar el microorganismo causante de una enfermedad y hacerlo crecer en un cultivo puro, así pues, Robert Koch contribuyó de manera muy importante al desarrollo de técnicas de cultivos bacterianos con la introducción de medios sólidos y procedimientos para la obtención de cultivos de especies puras mediante estrías en el medio sólido. Entre 1882 y 1900 se habían aislado muchos de los microorganismos causantes de enfermedades bacterianas y se habían implementado medidas preventivas.

Collard (1985) añade que:

Gracias al auge que la microbiología obtuvo durante el siglo XX, el estudio de la fisiología y la bioquímica bacteriana representó ser un tema de fundamental importancia en dicho siglo y se vio impulsado por el aislamiento de enzimas libres de células y el desarrollo de la bioquímica en Alemania e Inglaterra a principios del siglo. El estudio de la bioquímica bacteriana no sólo descubrió algunas de las rutas metabólicas por las cuales se sintetizan moléculas más complejas, sino que llevó también a un conocimiento más profundo acerca de los mecanismos de la expresión génica resumida en el aforismo <<un gen una enzima>>. Gracias al estudio

de la genética bacteriana se desarrolló el tema nuevo de la genética molecular. (p. 5)

El uso de colorantes de origen vegetal data del año de 1869, gracias a que Hoffman utilizó el carmín para teñir a las bacterias. En 1875 Weigert utilizó el azul de metileno sintético también con el fin de teñir a las bacterias. Y un año después, en 1876, Robert Koch describió por primera vez endosporas bacterianas, al año siguiente, Koch fue el primero en preparar películas secas de bacterias tiñéndolas con azul de metileno.

En 1878 Abbé Zeiss introdujo las lentes de inmersión en aceite. En 1882 Koch logró teñir el bacilo de la tuberculosis con azul de metileno alcalino utilizando calor para conseguir la penetración de su envuelta cerosa.

En los años siguientes a la publicación de la técnica de Gram, se hizo evidente que dicho método también era de gran utilidad para dividir a las bacterias en dos clases; las que retenían el colorante violeta fueron clasificadas como Gram positivas y las que se decoloraban y retenían el color rosáceo mediante la técnica de recuento por tinción, como Gram negativas.

En 1882 Ziehl realizó una modificación a la técnica de Gram introduciendo al fenol con el violeta de metilo en lugar del agua de anilina, a su vez, en 1883, Neelsen modificaría la técnica de Ziehl describiendo sus modificaciones para la tinción diferencial del bacilo tubérculo. Las microbacterias resisten la decoloración y se tiñen de rojo, mientras que las células del tejido y otras bacterias que resultan decoloradas se someten al recuento por tinción con azul de metileno o verde de malaquita.

Gracias a todos los descubrimientos, experimentos y observaciones de todos los científicos mencionados, para finales del siglo XIX, la mayoría de las características morfológicas externas de las bacterias eran conocidas.

Decré et al (2000) mencionan que:

Las tinciones en microbiología son las primeras herramientas que se utilizan en el laboratorio para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, pues brindan orientación rápida sobre el probable agente etiológico de una enfermedad y desde hace más de un siglo han ayudado a resolver problemas de tipo microbiano. 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, hongos y virus -. La tinción de Gram se considera básica en la valoración inicial de muestras para análisis bacteriológico, mientras que la tinción de Wright se utiliza para el diagnóstico de enfermedades muy particulares en el rubro de la parasitología y para la identificación de algunos de los efectos y reacciones propios de las infecciones virales, así como el estudio de las enfermedades no infecciosas como lo son las hematológicas. Hay tinciones que resultan ser muy específicas y son de gran utilidad, como la tinción de Ziehl-Neelsen, que es utilizada en el diagnóstico de enfermedades crónicas como la tuberculosis o la actinomicosis, gracias al poder diferencial que posee dicha técnica, así como también la tinción de azul de lactofenol que es muy utilizada para preservar e identificar los componentes estructurales de los hongos.

En el área de la microbiología, el microscopio y las tinciones son utilizadas de manera rutinaria, ya que nos ayudan a obtener información de mucha importancia en cuanto a la identificación de los distintos géneros y especies con las cuales se puede trabajar y estudiar. (p. 232-235)

Al realizar la inspección de cualquiera que fuese la muestra, el poder de resolución del microscopio es de suma importancia, pues la resolución es la capacidad que posee un objetivo para distinguir la distancia mínima existente entre dos puntos del objeto para que se puedan visualizar como dos puntos completamente separados.

Guarner (2011) añade que:

El poder de resolución de un objetivo es el responsable de la calidad, claridad, nitidez y enfoque detallado 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 es necesaria una amplificación de aproximadamente 1000-1400 x, mientras que el poder de resolución del ojo humano es solamente de aproximadamente 0.2 mm.

Para aprovechar esta ventaja dada por los microscopios, se han desarrollado diferentes técnicas tintoriales, con el fin de destacar las características morfológicas de los microorganismos y que pueden ser sometidos a un solo colorante o a mezclas de ellos. (p. 247)

Fung & Theriot. (1998) explican que:

Un colorante se define como una sustancia capaz de dar color a células, tejidos, fibras, artefactos, microorganismos, etcétera, que, de acuerdo con su origen, se pueden dividir en colorantes naturales y colorantes artificiales. Los colorantes naturales son aquellos que son extraídos u obtenidos de plantas o animales y los colorantes artificiales son aquellos que se obtienen a partir de minerales procesados y manipulados en el laboratorio, también se incluyen aquellos que son sintetizados químicamente. Hablando de la estructura química de los colorantes, es bien sabido que están constituidos de un componente cromóforo y un componente auxocromo.

El cromóforo es todo grupo aislado, covalente e insaturado, que tiene una absorción característica en la región ultravioleta o visible; dicho en otras palabras, es la capacidad que tiene una molécula para que sus electrones absorban energía o luz visible, se exciten y emitan diversos colores de acuerdo con la longitud de onda emitida como resultado del cambio en el nivel energético. Cabe mencionar que esta longitud de onda corresponde al rango dentro del espectro visible. (Figura 1). Los cromóforos se pueden

presentar en dos formas fundamentales, en sistemas conjugados pi o complejos metálicos.

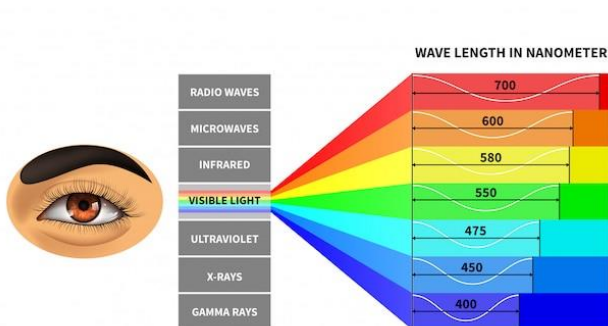


Figura 1. Esquema del espectro electromagnético y la luz visible recuperado de: <https://bit.ly/3afAYeF>

Los cromóforos son principalmente grupos funcionales con: dobles o triples enlaces carbono-carbono, anillos aromáticos, grupos carbonilo, Imino, diazo, nitro y enlaces 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 onda largas para aumentar la intensidad. Los siguientes grupos funcionales son considerados auxócromos: metilo, halógenos, hidroxilo, alcoxi, amino.

Aunque los microorganismos vivos se pueden observar directamente in fresco al microscopio óptico gracias a la técnica de gota suspendida y otras tantas que nos permiten observarlos vivos, en la mayoría de ocasiones tenemos la necesidad de ocupar colorantes para que por medio de los mismos sea mucho más sencillo identificar a dichos microorganismos, así como para poder observar las estructuras que los conforman; además, nos permite estudiar la reacción a determinadas técnicas y por lo tanto nos

permite clasificarlos. 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. (p. 346-351)

Guarner (2011) realiza la clasificación de las tinciones de la siguiente manera:

Como simples cuando toda la muestra a tratar se tiñe de un solo color y únicamente se utiliza un colorante (azul de metileno o tinta china); las tinciones diferenciales son todas aquellas en las cuales se visualiza más de un color, esto debido a que en la realización de la técnica de tinción se utiliza más de un colorante (Gram o Ziehl-Neelsen); también existen las llamadas tinciones específicas, que son todas aquellas en las que se utilizan anticuerpos marcados con una molécula fluorescente para identificar una estructura celular en particular (inmunocitoquímico). (p. 248-250)

El control de calidad de las diferentes técnicas de tinción es importante, ya que así se asegura que la preparación de la muestra haya sido la adecuada, por lo que se recomienda realizar al mismo tiempo la evaluación de la muestra clínica, la tinción de un agente infeccioso ya identificado mediante la misma tinción, el cual funcionará como un control positivo.

Calvo (2011) menciona que:

Algunas técnicas para realizar tinciones como lo son Gram o Ziehl-Neelsen requieren que antes de su proceso la muestra sea fijada, esto con la finalidad de preservar la arquitectura estructural y química de las células. 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 como: óxido crómico, ácido acético, ácido pícrico, acetona, dicromato de potasio, etc. Los agentes químicos reductores son: formaldehído, glutaraldehído, etanol, metanol, paraldehído, etcétera.

Fung (1998) asegura que:

Quizá el método físico con mayor utilización en la microbiología es el calor seco, que consiste en exponer directamente la laminilla con la muestra 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) repercutirán 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. Es muy importante señalar que la fijación por calor seco no puede ser utilizada cuando el patógeno que se trabaja se transmite por vía aérea debido a que en el proceso pueden generarse aerosoles que pueden ser riesgosos para el personal.

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 y su concentración ideal es >99 %. El metanol preserva la integridad de los ácidos nucleicos, por lo que también es ideal para realizar técnicas de inmunohistoquímica e hibridación in situ. (p. 346-351)

La intensificación de la industrialización que se presentó en México durante la segunda mitad del siglo pasado, produjo una mayor demanda de materias primas para satisfacer el creciente consumo de una población en aumento y con patrones de consumo cambiantes y cada vez más demandantes. A la par crecieron la generación de residuos de distintos tipos y los problemas asociados para su disposición adecuada, así como las afectaciones a la salud humana y a los ecosistemas.

Los residuos se definen en la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) como aquellos materiales o productos cuyo propietario o poseedor desecha y que se encuentran en estado sólido o semisólido, líquido o gaseoso y que están contenidos en recipientes o depósitos; pueden ser susceptibles de ser valorizados o requieren sujetarse a tratamiento o disposición final conforme a lo dispuesto en la misma Ley (DOF 2003). En función de sus características y orígenes, se les clasifica en tres grandes grupos:

- Residuos sólidos urbanos
- Residuos de manejo especial
- Residuos peligrosos

El grupo en el que se enfoca el presente trabajo es en el de residuos peligrosos.

La gran diversidad de sustancias químicas que existen en la actualidad, si bien es cierto que ha servido para mejorar significativamente el nivel de vida de la población, también ha ejercido una presión importante sobre el medio ambiente y la salud humana. Una vez finalizada la vida útil de muchos de los productos que se fabrican a partir de estas sustancias o que las contienen, se convierten en desechos que ponen en riesgo la salud de las personas o pueden causar daños al medio ambiente. Entre otros desechos se encuentran los residuos peligrosos,

definidos como aquellos que poseen alguna de las características **CRETIB** que les confieren peligrosidad (corrosividad **C**; reactividad **R**; explosividad **E**; toxicidad **T**; inflamabilidad **I**; o ser biológico-infecciosos, **B**), así como los envases, recipientes, embalajes y suelos que hayan sido contaminados según lo establece la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR). La NOM-052-SEMARNAT-2005 establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

Los residuos peligrosos pueden manejarse y/o disponerse de manera segura de distintas formas:

- Por el reciclaje y reuso previo a su tratamiento y disposición final
- Por medio del tratamiento que reduce su peligrosidad
- Por su incineración bajo condiciones controladas
- Por su confinamiento en sitios adecuados para ello

Para llevar a cabo estos procesos, los residuos deben transportarse previamente y de manera segura desde sus sitios de origen hasta las instalaciones donde serán manejados o dispuestos para su confinamiento.

A continuación, se mencionarán las principales técnicas de tinción utilizadas en microbiología, citogenética, hematología, parasitología, micología, histología, análisis bioquímico clínicos, inmunología, que son algunas de las materias impartidas en la FES-C, así como su fundamento, composición, interpretación para realizar la correcta identificación de los microorganismos, células, tejidos, etcétera, así como el tratamiento de los residuos que se generan al realizar cada una de las técnicas para garantizar una mínima repercusión al medio ambiente.

5 TINCIÓN DE GRAM

Resulta casi imposible pensar que una persona que se dedique a la microbiología no haya realizado una tinción de Gram. Desde la época del bachillerato tuvimos la oportunidad de realizar esta tinción en diversas asignaturas y es casi una ley el aprender a realizar la tinción de Gram.

Una de las figuras más emblemáticas e icónicas en el área de la microbiología es el científico Hans Christian Joachim Gram. Nació en Copenhague en el año de 1853. Desde muy temprana edad, Gram tuvo inclinación por las ciencias naturales, fungió como asistente de botánica y zoología. Se inscribió en la facultad de Medicina de la Universidad de Copenhague, titulándose en el año de 1878. Realizó estudios acerca del número y tamaño de los glóbulos rojos, profundizó sus estudios en farmacología y bacteriología.

Murray (2007) dice que:

La tinción de Gram es un procedimiento de gran utilidad empleado en los laboratorios donde se manejan pruebas microbiológicas. Es definida como una tinción diferencial, ya que hace el uso de dos colorantes y nos ayuda a clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. Fue desarrollada en el año de 1884 por el científico danés ya mencionado; hoy en día, es una de las tinciones más utilizadas a nivel mundial gracias a lo económico, rápido, sencillo y eficaz que resulta. (p. 275-277)

En microbiología clínica realizar la tinción de Gram es de gran ayuda, pues a partir de muestras clínicas directas provenientes de sitios estériles se puede saber de manera rápida y sencilla las características de la muestra y hacer una diferenciación de los posibles microorganismos causantes de una infección, y así, orientar a los profesionales de la salud en la elección del tratamiento adecuado de la infección y los pasos que se deben de seguir para el diagnóstico correcto.

Fundamento

Nagata (2010) afirma que

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 (-) está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram (+) poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con una membrana celular externa; así pues, a composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram (+) y Gram (-) explica y determina las características por las cuales se tiñen de diferente manera los diversos microorganismos (Figura 2). (p. 490-497)

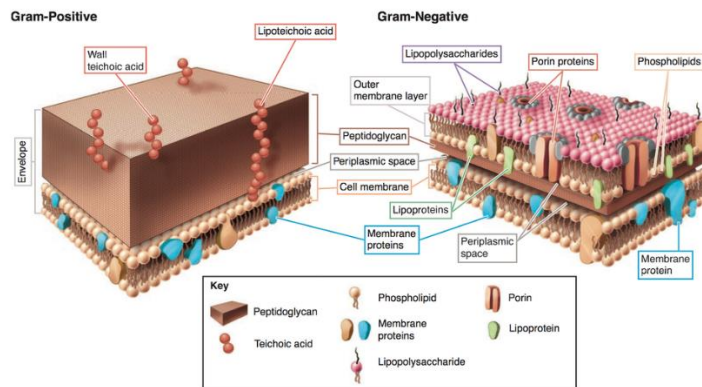


Figura 2. Esquema de las diferencias estructurales entre bacterias Gram (+) y (-).
Recuperado de: <https://bit.ly/3lqcVGm>

Popescu (1996) dice que:

La tinción de Gram se basa en colocar como colorante primario al cristal violeta, el cual tiene afinidad por el peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Posteriormente, se coloca Lugol, el cual sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta mediante la formación de un complejo cristal violeta-yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana y lo estabiliza. Enseguida, 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 (-), debido a que esta es soluble a la acción de solventes orgánicos, como la mezcla de alcohol-acetona. Las bacterias Gram (+), al poseer una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza el complejo formado, mientras que las Gram (-) no lo pueden retener por tener una menor cantidad de peptidoglicano. Por último, se coloca la safranina, la cual funciona como un colorante secundario o de contratinción y que sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo. (p- 145-151)

Beveridge (1991) dice que:

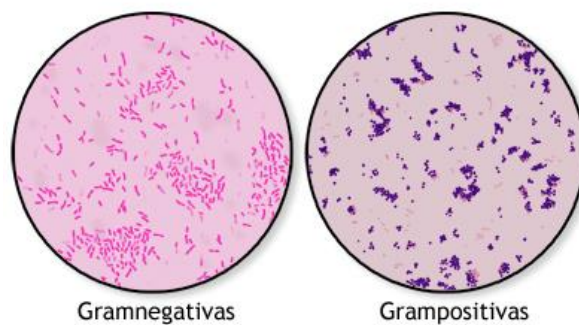
Hay bacterias de un mismo género que pueden observarse en la misma muestra como Gram (+) y como Gram (-), cuando ocurre esta situación se le conoce como tinción Gram variable secundaria a la alteración en nutrientes, temperatura, pH, concentración de electrolitos, al número de pases en medios sintéticos *in vitro* y al envejecimiento del cultivo. (p. 684-705)

Murray (2007) afirma que:

No todas las bacterias se pueden teñir utilizando la técnica de Gram, ya que carecen de pared celular (micoplasma) o su pared celular tiene una composición química diferente como lo son las micobacterias que poseen 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, entre otras. Las bacterias Gram (+) se observan de color azul oscuro a morado, mientras que las Gram (-) se observa de color rosa a rojo (Figura 3).

Procedimiento

1. Tomar un portaobjetos y revisar que se encuentre en óptimas condiciones de uso.
2. Colocar sobre el portaobjetos la muestra a tratar.
3. Fijar la muestra con calor (mechero).
4. Colocar la muestra fijada en una charola para tinción.
5. Añadir cristal violeta y dejar actuar durante 1 minuto.
6. Enjuagar con agua el exceso de colorante.
7. Añadir Lugol y dejar actuar durante 1 minuto.
8. Enjuagar con agua el exceso de Lugol.
9. Añadir un decolorante (alcohol o acetona) y dejarlo actuar durante 3-5 segundos.
10. Enjuagar con agua el exceso de decolorante.
11. Añadir safranina y dejar actuar durante 1 minuto.
12. Enjuagar con agua el exceso de safranina.
13. Dejar secar la muestra.
14. Observar al microscopio.



ADAM.

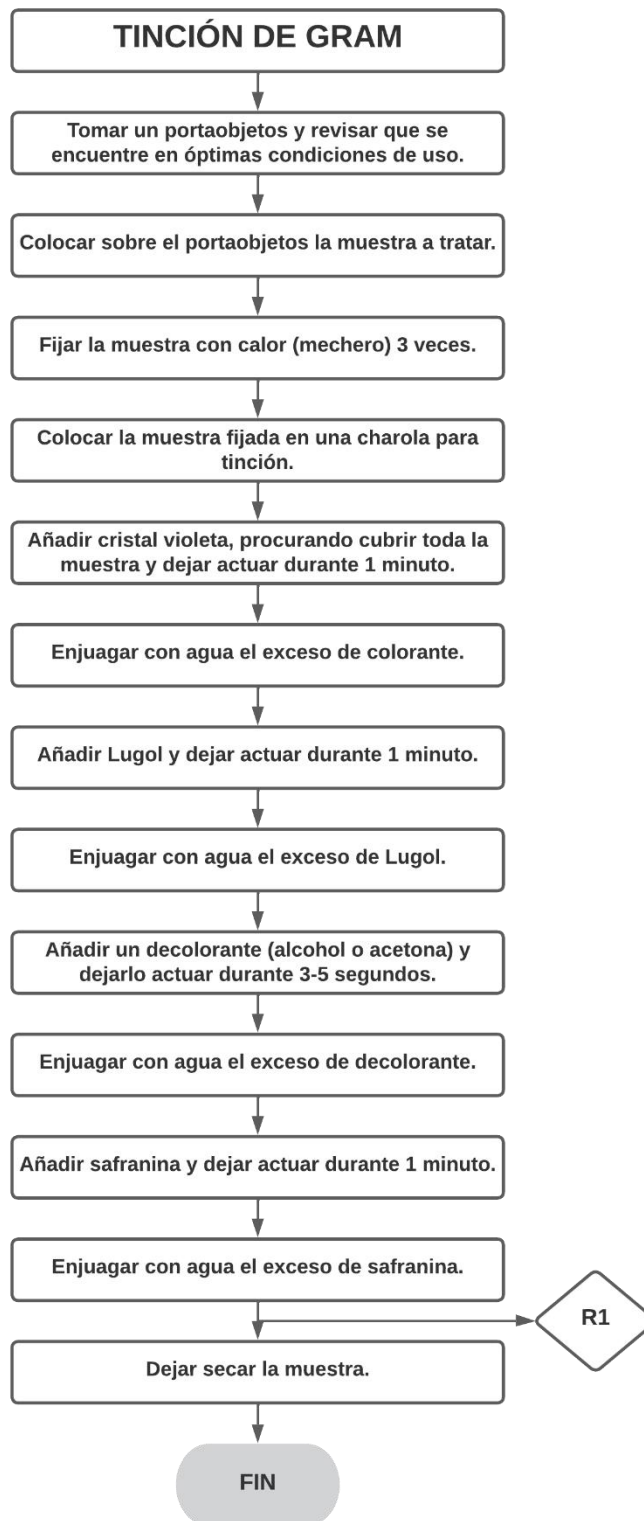
Figura 3. Visualización de bacterias Gram (+) y (-). En la imagen se puede observar la coloración característica al microscopio de bacterias Gram (-) (circulo izquierdo) y Gram (+) (circulo derecho). Las Gram (-) se observan de color rosa-rojo, pertenecientes a *Escherichia coli*. Y las Gram (+) se observan de color azul-morado, pertenecientes a *Streptococcus spp.* Recuperado de: <https://bit.ly/3RnbBrK>

Componentes de la tinción.

1. Cristal violeta
2. Lugol
3. Alcohol/Acetona
4. Safranina

Tratamiento de residuos.

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.



Todos los residuos se encuentran contenidos como una mezcla en la charola para tinción.
 R1: Calentar la mezcla hasta reducir el volumen al mínimo y proceder a almacenar en un recipiente apropiado, que proteja del daño físico, mantener lejos de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para evitar confusiones y mezclas con otras sustancias.

Tabla 1. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Cristal violeta, Lugol, alcohol/acetona y safranina	Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

6 TINCIÓN ZIEHL-NEELEN

Prescott (2000) menciona que:

La tinción de Ziehl-Neelsen es la técnica comúnmente usada en el diagnóstico rutinario de la 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: aquellas que son capaces de resistir la decoloración con alcohol-ácido y aquellas que no lo son. La sensibilidad de esta tinción para identificar bacilos ácido-alcohol resistentes es del 74 % y la especificidad del 98 %, teniendo un límite de detección de 5000-10000 bacilos/mL de muestra. (p. 110)

Selvakumar et al (2002) afirman:

Que 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 (*Gordonia*, *Tsukamurella* y *Rhodococcus*), los cuales también pueden ser teñidos con esta tinción. 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. (p. 3041-3043)

Fundamento

La pared celular está compuesta por ácido mesodiaminopimélico, alanina, ácido glutámico, glucosamida, ácido murámico, arabinosa y galactosa (Figura 4).

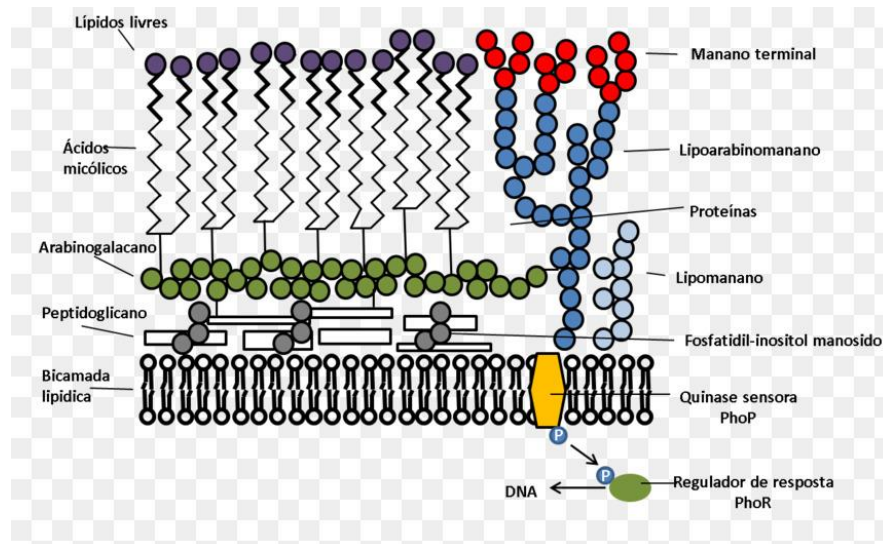


Figura 4. Representación en esquema de la pared celular de las micobacterias. Recuperada de: <https://bit.ly/3aZt610>

Murray (2007) describe que:

Los ácidos micólicos (70-90 número de átomos de carbono) junto con los 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.

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 se vuelven a solidificar, resistiendo la acción abrasiva del alcohol-ácido, y el azul de metileno se utiliza como contratinción (Figura 5). (p. 543)

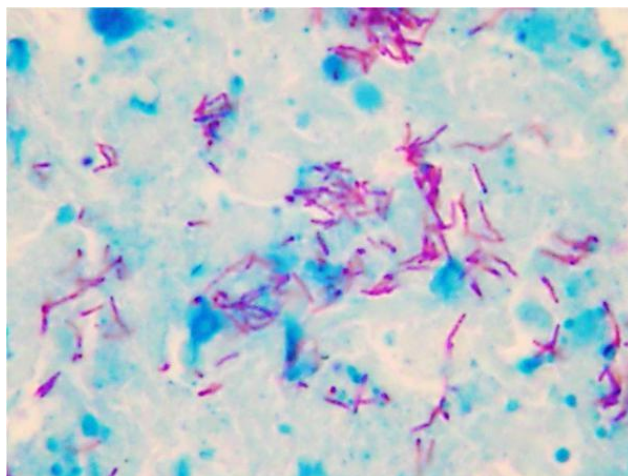


Figura 5. *Mycobacterium tuberculosis* observada al microscopio con tinción de Ziehl-Neelsen. Recuperada de: <https://bit.ly/3PVgjeZ>

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 con la siguiente tabla:

Tabla 2. 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	1-3/300 (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= observaciones de la laminilla

Procedimiento

1. Tomar un portaobjetos y revisar que se encuentre en óptimas condiciones de uso.
2. Realizar en el portaobjetos un extendido de la muestra.
3. Añadir al frotis el primer colorante (carbofucsina) procurando cubrir el total de la muestra.
4. Pasar por el mechero el portaobjetos con la muestra varias veces, durante 5 minutos, evitando que el colorante hierva.
5. Decantar y enjuagar con agua el exceso de colorante.
6. Decolorar con alcohol-ácido hasta que la muestra tenga un color rosado.
7. Enjuagar la muestra con agua destilada.
8. Añadir a la muestra azul de metileno y dejarlo actuar durante un minuto.
9. Enjuagar la muestra con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
10. Dejar secar el portaobjetos al aire.
11. Observar al microscopio y reportar resultados.

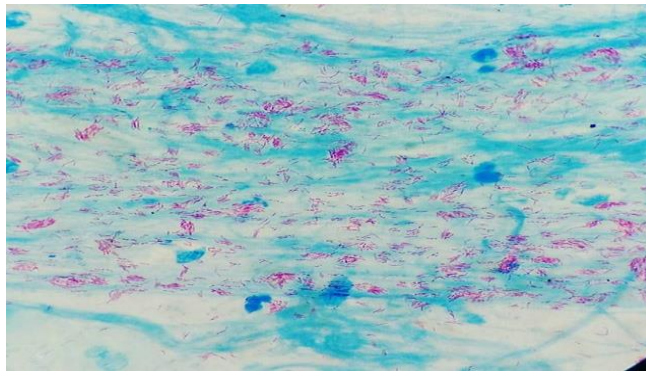


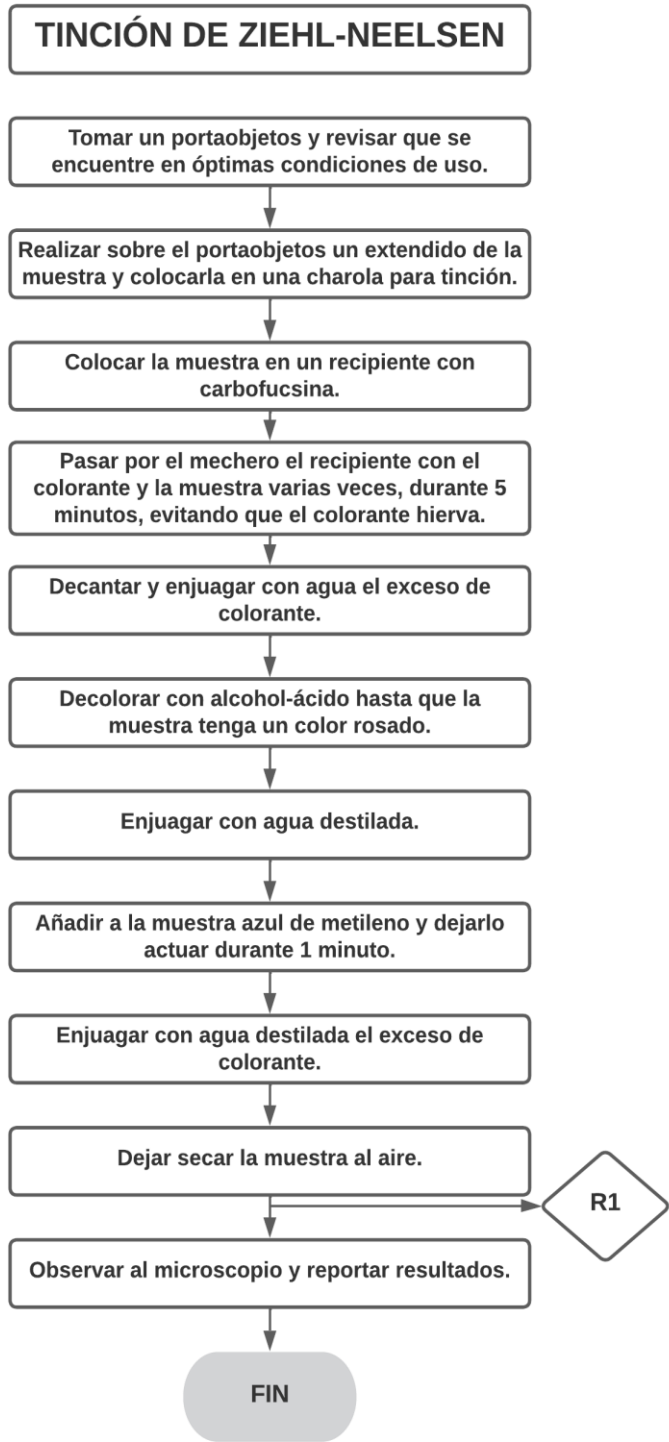
Figura 6. En la imagen se pueden observar bacilos de color rosado, color característico de las micobacterias ácido-alcohol resistentes (+), gracias a la afinidad del colorante por los ácidos micólicos. Recuperada de: <https://bit.ly/3Xcmz68>

Componentes de la tinción.

1. Carbofucsina
2. Alcohol/ácido (3 mL de HCl 0.36 N en 100 mL de etanol de 96°)
3. Azul de metileno

Tratamiento de residuos.

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada, usando la etiqueta vigente en la FES-C.



Todos los residuos se encuentran contenidos como una mezcla en la charola para tinción.
 R1: Calentar la mezcla hasta reducir el volumen al mínimo y proceder a almacenar en un recipiente apropiado, que proteja del daño físico, mantener lejos de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para evitar confusiones y mezclas con otras sustancias.

Tabla 3. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Carbofucsina, alcohol-ácido y azul de metileno	Corrosividad Reactividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

7 CRISTAL VIOLETA

El cristal violeta es un colorante orgánico, sintético y alcalino de triamino-trifenilmetano. Se encuentra como un polvo con brillo metálico verde oscuro. Recibe varios nombres, entre los cuales se puede mencionar cloruro de hexametil pararosanilina o violeta de metilo, violeta de anilina, violeta de genciana, etc.

Se obtiene mediante varias rutas, las cuales incluyen reacciones de condensación, adición, cloración, entre otras. Todas tienen como materia prima la N, N-dimetilanilina. Se emplea como componente de las tintas usadas para realizar impresiones y en la de los bolígrafos, Asimismo, se usa para teñir cuero, papel, detergentes, fertilizantes, entre otros productos. Fue utilizado como antiséptico. Tiene propiedades antimitóticas, antibacterianas, antiparasitarias y antimicóticas. Su mecanismo de acción es bacteriostático. Es empleado en histología para teñir los cortes de tejidos y en microbiología para colorear y clasificar las bacterias conforme a sus propiedades de tinción con la coloración de Gram. (Chemical Book, 2017)

Las esferas azules corresponden a los átomos de nitrógeno, y en la cima, yace un nitrógeno con carga formal positiva, el cual atrae el anión Cl⁻ (esfera verde). La estructura es plana en los tres anillos aromáticos, debido a la hibridación sp² de sus átomos de carbono. Nótese que, aunque el anillo superior sea aromático, no contiene las líneas punteadas en su interior. Esto significa que la resonancia de sus enlaces dobles no se encuentra favorecida.

La molécula del cristal es notoriamente polar. ¿Por qué? Porque los tres átomos electronegativos de nitrógeno ceden su par de electrones libres a los anillos aromáticos, y parte de esta densidad electrónica es atraída por el átomo de nitrógeno con carga parcial positiva (N⁺). Esta propiedad se evidencia en su alto punto de ebullición, muy superior al del agua. (Figura 7).

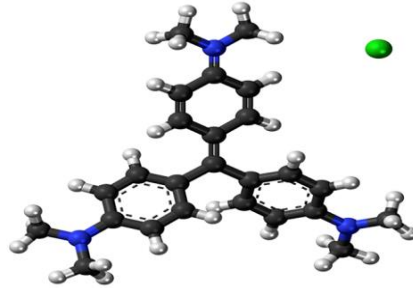


Figura 7. Estructura de la molécula de triamino-trifenilmetano, recuperada de: <https://bit.ly/2S5fhiA>

El cristal violeta ha sido obtenido por diversas rutas. Fue preparado por primera vez por Caro y Kern, dos químicos alemanes que hicieron reaccionar dimetilanilina con fosgeno. Esta reacción dio como resultado un producto intermedio, la 4,4'-bis(dimetilamino) benzofenona, conocida también como cetona de Michler. Seguidamente esta cetona se hizo reaccionar con más dimetilamina con oxicloriguro de fósforo y ácido clorhídrico. Al reactivo mixto de iodo con el cloriguro de cristal violeta se le conoce como violeta de genciana. Otra manera de preparar el cristal violeta es mediante la reacción de condensación de dimetilamina y formaldehído, dando como resultado un colorante blanco.

Dependiendo de las condiciones de pH, luz o calor, este colorante blanco puede sufrir transformaciones reversibles que oscilan entre dos colores pasando por el incoloro. (Chemical Book, 2017)

Fundamento

El cristal violeta forma parte de los componentes del método de la coloración de Gram. Este permite clasificar las bacterias como bacterias Gram (+), o bacterias Gram (-). Algunas de ellas, sin embargo, no se colorean con el Gram.

El uso del cristal violeta se basa en la penetración de éste a través de la gruesa pared celular de las bacterias. Así, su estructura celular retiene el colorante, tiñendo a la bacteria de morado, Este es el caso de las bacterias Gram (+). Mientras que, si las bacterias tienen una pared celular delgada, se catalogan como

bacterias Gram (-). Debido a esto, el colorante no logra permanecer el tiempo suficiente dentro de ellas para teñirlas (entra y sale la molécula de triamino-trifenilmetano con facilidad).

Posteriormente en el proceso de contratinción que lleva este mismo método de Gram, las bacterias se colorean con fucsina fenicada, quedando de color rosado. Cuando las bacterias no poseen pared celular, y no presentan ningún tipo de coloración, quedan clasificadas como bacterias que no se colorean con la técnica de Gram. (Chemical Book, 2017)

Tabla 4. *Diferentes usos del colorante Cristal Violeta.*

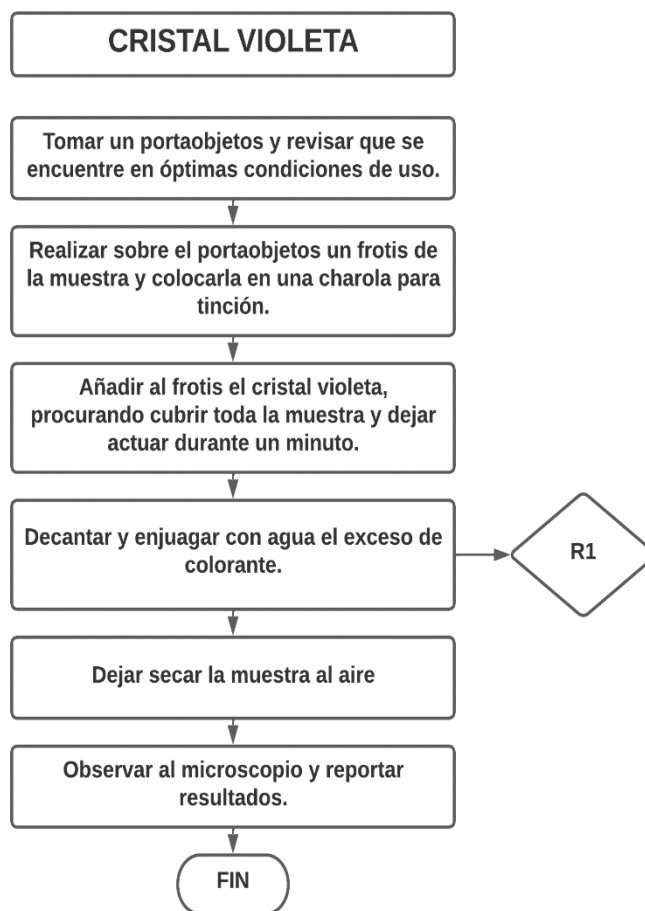
USOS DEL CRISTAL VIOLETA
Componente de tintas
Marcado temporal de piel
Componente en la tinción de Gram
Tratamiento de infecciones por diferentes microorganismos
Laboratorios e investigación biomédica

Componentes del colorante

1. Triamino-trifenilmetano

Tratamiento de residuos

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.



R1: Calentar la mezcla hasta reducir el volumen al mínimo y proceder a almacenar en un recipiente apropiado que proteja del daño físico, mantener lejos de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para evitar confusiones y mezclas con otras sustancias.

Tabla 5. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Triamino-trifenilmetano	Corrosividad Toxicidad	Almacenar el un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

8 ROJO CONGO

Merck (2015) menciona que:

Es una tinción que sirve para la identificación de amiloide según Highman, es utilizado para el diagnóstico celular en la medicina humana y se emplea en el examen histológico de muestras de origen humano. El amiloide es una estructura compuesta de fibrillas proteicas (\varnothing 8-15 nm cada una), homogénea y teñible de forma eosinófila que se deposita entre las células p. ej. en caso de amiloidosis. Todos los depósitos de amiloide contienen fibrillas proteicas parecidas que son resistentes a los mecanismos de defensa del organismo y que ni pueden ser eliminadas. (p. 453-454)

Fundamento

Merck (2015) afirma que:

La tinción de Rojo Congo se realiza sobre la base de enlaces por puente de hidrógeno con el componente de carbohidrato del sustrato. El Rojo Congo es un colorante aniónico y puede depositarse en fibrillas de amiloide, las cuales presentarán en este caso un destacado dicroísmo bajo luz polarizada. Al trasluz, el tejido teñido con Rojo Congo aparece en color naranja-rojo, mientras que, si se mira bajo luz polarizada, los depósitos de amiloide se presentan en forma de doble refracción de color verde intenso sobre fondo oscuro. Hay otros materiales que también se tiñen con Rojo Congo, como p. ej. el colágeno, pero que, sin embargo, no son visibles bajo luz polarizada. La tinción puede ser técnicamente difícil si se utilizan cortes de parafina demasiado finos ($<5 \mu\text{m}$) o si el tejido ha sido sometido a una sobretinción excesiva. Como material de partida se emplean cortes de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (cortes parafínicos de 5-6 μm de espesor).

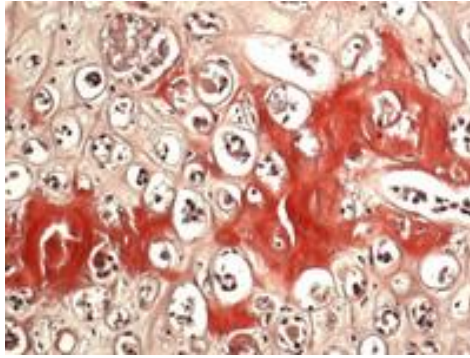


Figura 8. Muestra tratada con la tinción Rojo Congo. Recuperada de: <https://bit.ly/3zcgvQ1>



Figura 9. Esporangios y esporas teñidas con Rojo Congo. Recuperada de: <https://bit.ly/3zzgl13>

Procedimiento

1. Preparar el corte histológico o frotis de manera correcta.
2. Una vez preparado el corte, colocar la muestra en agua destilada durante 1 minuto.
3. Agregar hematoxilina modificada durante 5 minutos.
4. Lavar la muestra con agua de grifo durante 5 minutos.
5. Agregar colorante Rojo Congo y dejarlo actuar durante 10 minutos.
6. Lavar la muestra con agua de grifo durante 5 minutos.
7. Agregar solución de KOH y dejar actuar durante 30-40 segundos.
8. Lavar con agua de grifo durante 5 minutos.
9. Agregar etanol al 96% y dejarlo actuar durante 1 minuto.

10. Agregar etanol absoluto y dejarlo actuar durante 2 minutos.
11. Dejar secar la muestra al aire.
12. Observar al microscopio y registrar resultados.

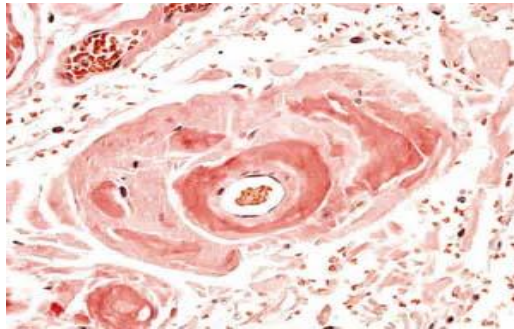


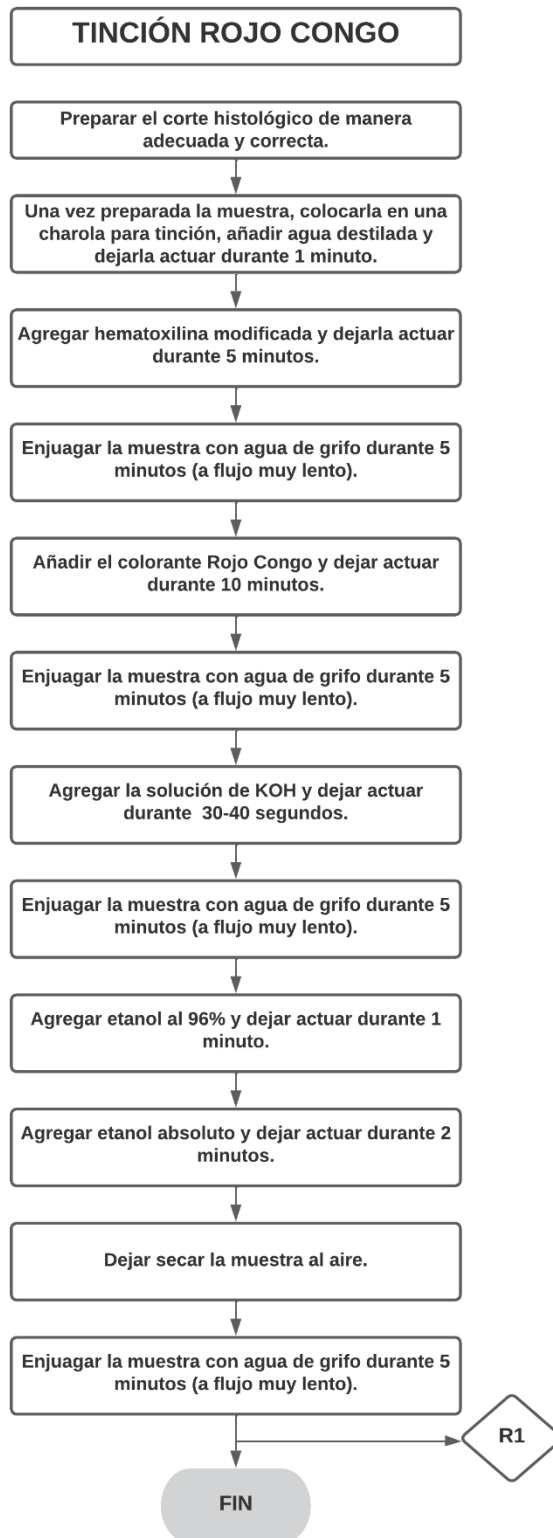
Figura 10. Muestra histológica conjuntiva teñida con Rojo Congo, en la cual se observa amiloidosis primaria conjuntival, con la coloración característica de esta tinción para tejido conjuntivo. Núcleos celulares azul oscuro. Amiloide al trasluz rosa a rojo, bajo luz polarizada metacromasia verde. Tejido conjuntivo, colágeno rojo claro. Recuperada de: <https://bit.ly/3z7AEqB>

Componentes de la tinción

1. Hematoxilina
2. Rojo Congo
3. KOH
4. Etanol

Tratamiento de residuos

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.



Todos los residuos se encuentran contenidos como una mezcla en la charola para tinción.
 R1: Calentar la mezcla hasta reducir el volumen al mínimo y proceder a almacenar en un recipiente apropiado, que proteja del daño físico, mantener lejos de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para evitar confusiones y mezclas con otras sustancias.

Tabla 6. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Hematoxilina, rojo congo, KOH y etanol	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

9 TINCIÓN FLAGELAR

Los flagelos son apéndices filamentosos de la superficie bacteriana, compuestos por proteínas específicas denominadas flagelinas con peso molecular relativamente bajo, que varía entre 17 000 y 40 000. El aparato flagelar está constituido por tres regiones distintas. La región más externa es el filamento helicoidal formado por flagelina. Cerca de la superficie celular está unido a un gancho de diámetro algo mayor, constituido por un tipo diferente de proteína. Este, a su vez, se halla unido a un cuerpo basal alojado por completo dentro de la envoltura celular, estructura que consta de un pequeño cilindro central insertado en un sistema de anillos. (Figura 11). (Facultad de Medicina Argentina, 2015)

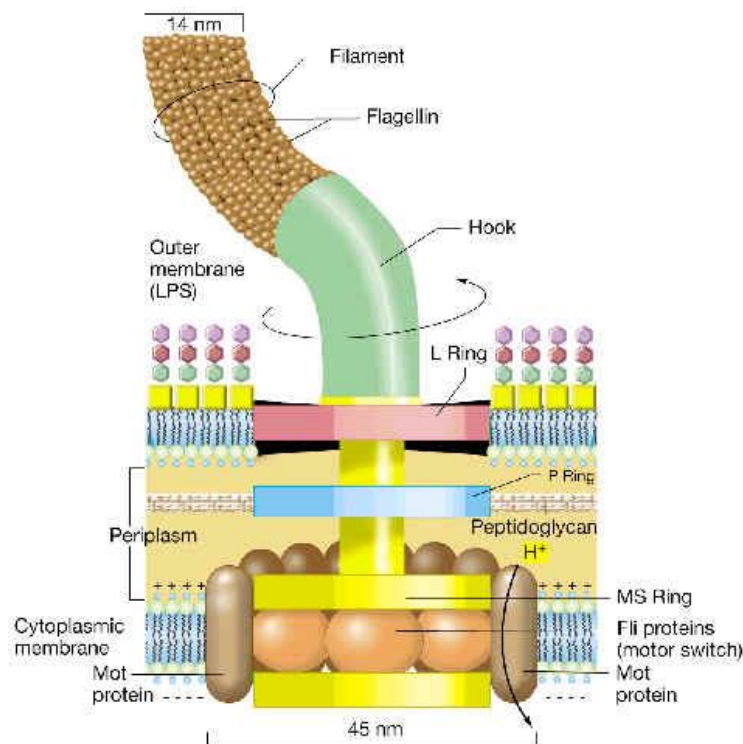


Figura 11. Esquema de la composición de un filamento bacteriano. Las bacterias móviles poseen flagelos con una ubicación característica y puede utilizarse para diferencias especies y géneros. Recuperada de: <https://bit.ly/3cNB3Hd>

Fundamento

Los flagelos son estructuras demasiado finas para ser visibles al microscopio óptico. Sin embargo, si se tratan con suspensiones coloidales de sales de ácido tánico puede ponerse de manifiesto su presencia y disposición en la célula, por medio de la formación de un precipitado grueso que se deposita sobre la pared celular y los flagelos. De esta forma, el diámetro de estas estructuras aumenta de tal modo que una tinción subsiguiente con fucsina básica (coloración de Leiffson) o nitrato de plata (impregnación argéntica), las hace visibles en el microscopio óptico. Es una tinción útil en la identificación de bacilos Gram (-) no fermentadores. (Figura 12). (Facultad de Medicina Argentina)

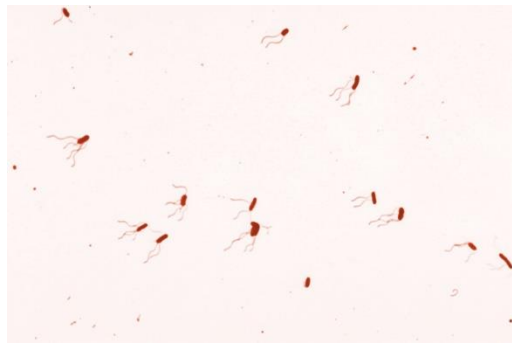


Figura 12. Muestra tratada con tinción flagelar, observada al microscopio. Recuperada de: <https://bit.ly/3PlpjnO>

Procedimiento

1. Tomar un portaobjetos y revisar que se encuentre en óptimas condiciones de uso.
2. Tomar el cultivo bacteriano que servirá como muestra.
3. Tomar con asa bacteriológica la muestra bacteriana.
4. Colocar la muestra en un tubo de ensayo con agua estéril.
5. Colocar en el portaobjetos, con asa bacteriológica, 1 o 2 gotas de muestra.
6. Añadir a la muestra fucsina y dejar actuar durante 5-15 minutos. (Se formará un precipitado).

7. Lavar el precipitado con agua destilada.
8. Dejar secar la muestra al aire
9. Observar al microscopio y registrar resultados.

Preparación del colorante

1. Fucsina básica (1.2 g de acetato de pararosa anilina).
100 mL de etanol 95°.
2. Ácido tánico (3 g).
100 mL de agua destilada.
Agregar fenol para una concentración 1/2000
3. Cloruro de sodio (1.5 g).
100 mL de agua destilada.

Mezclar los componentes en partes iguales y refrigerar.

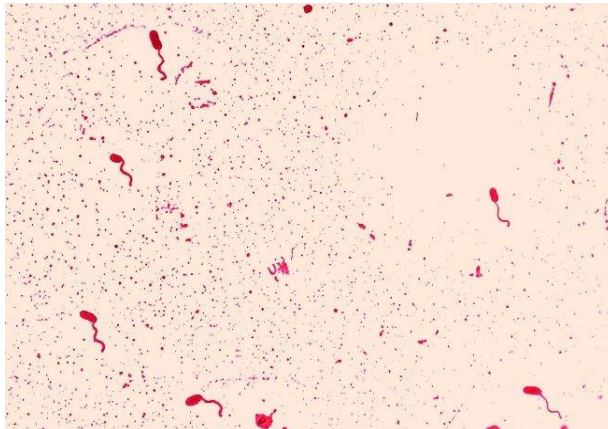


Figura 13. Se observan los flagelos de color rojo, además de un engrosamiento notorio de los mismos. Recuperada de: <https://bit.ly/3clDlaw>

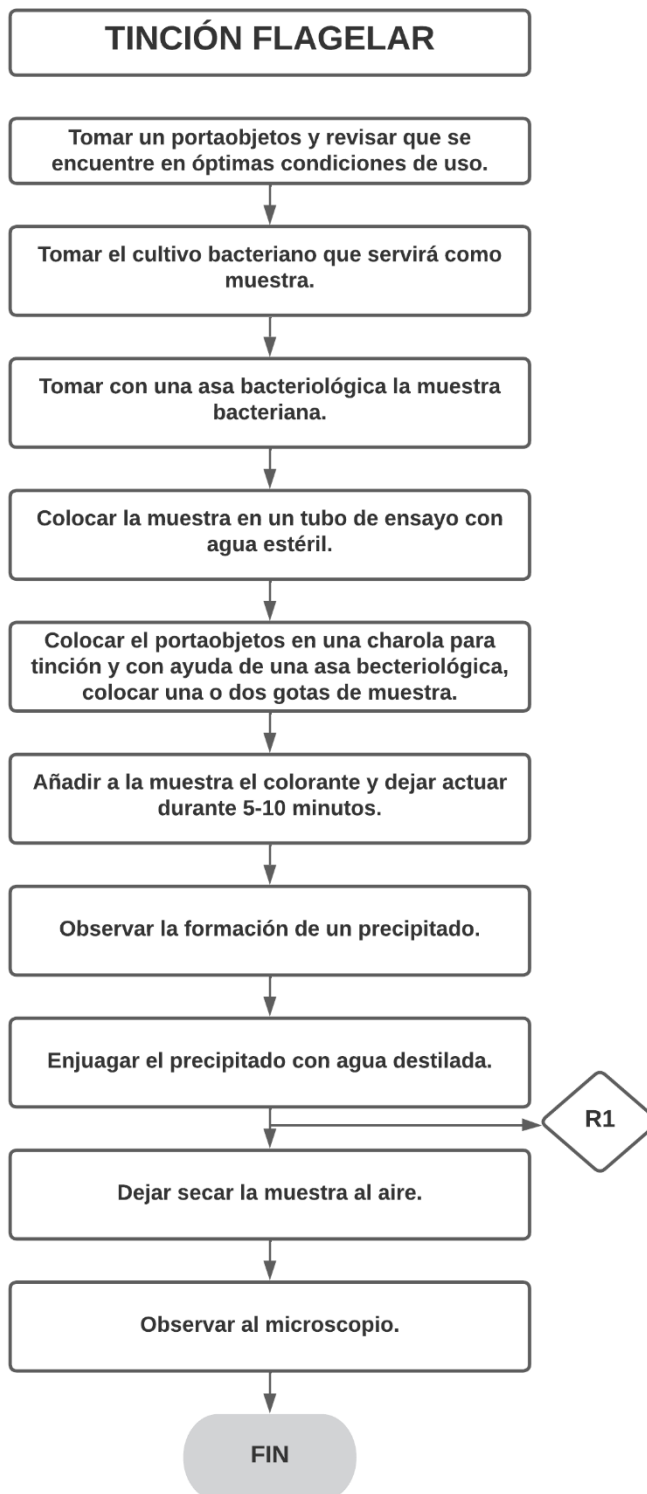
Componentes de la tinción

1. Fucsina básica
2. Etanol
3. Ácido tánico
4. Fenol

5. Cloruro de sodio

Tratamiento de residuos

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.



Todos los residuos se encuentran contenidos como una mezcla en la charola para tinción.
 R1: Calentar la mezcla hasta reducir el volumen al mínimo y proceder a almacenar en un recipiente apropiado, que proteja del daño físico, mantener lejos de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para evitar confusiones y mezclas con otras sustancias.

Tabla 7. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Fucsina básica, etanol, ácido tánico, fenol y cloruro de sodio	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

10 TINCIÓN DE ESPORAS (WIRTZ-CONKLIN O SHAFFER FULTON)

Fundamento

Algunos géneros bacterianos, entre los que destacan *Clostridium* y *Bacillus*, producen en su interior formas de resistencia denominadas endosporas. Se producen cuando las condiciones ambientales son desfavorables (agotamiento de los nutrientes, temperaturas extremas, radiaciones, compuestos tóxicos, etc.) formándose una espora por cada forma vegetativa. Al finalizar el proceso de esporogénesis, la célula vegetativa se lisa y libera la espora al exterior. Cuando el ambiente es favorable, la espora germina generando una nueva forma vegetativa. La capacidad de germinar perdura durante años. Algunas de las bacterias productoras de endosporas son patógenas para el hombre, por lo que su estudio y observación son de enorme interés.

Las endosporas poseen unas cubiertas exclusivas que las hacen resistentes a los factores ambientales adversos. Además, estas cubiertas hacen que las esporas aparezcan en el microscopio óptico como estructuras refringentes y de difícil tinción. (Facultad de Medicina Argentina, 2017)

La tinción específica de esporas requiere dos colorantes:

1. Verde de malaquita: capaz de teñir las esporas en caliente.
2. Safranina: colorante de contraste que tiñe las formas vegetativas.

Las endosporas, tras la primera tinción, no perderán el colorante en el lavado con agua, y si lo harán las formas vegetativas, que quedarán teñidas con el segundo colorante. (Figura 14). (Facultad de Medicina Argentina, 2017)

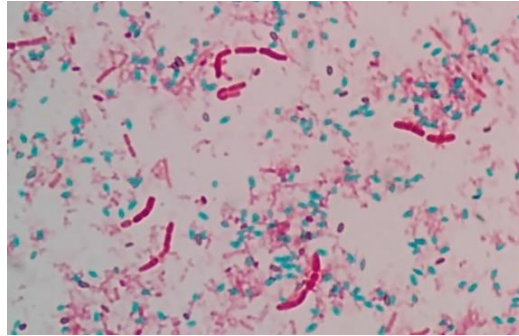


Figura 14. Muestra teñida con la tinción de Wirtz-Conklin para endosporas, observada a microscopio óptico. Recuperada de: <https://bit.ly/3JaTNN3>

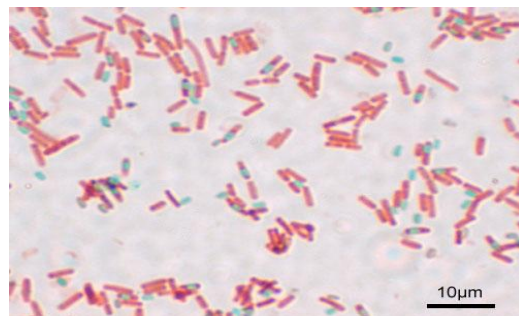


Figura 15. Muestra teñida con la tinción de Wirtz-Conklin, se observan endosporas de color verde. Recuperada de: <https://bit.ly/3SbcFzm>

Procedimiento

1. Tomar un portaobjetos y revisar que se encuentre en óptimas condiciones de uso.
2. Preparar los frotis bacterianos adecuados y de manera correcta.
3. Colocar la muestra en un recipiente que contenga el colorante verde de malaquita.
4. Calentar el colorante durante 5 minutos. (Añadir más colorante en caso de ser necesario, con el fin de evitar que el mismo hierva o se seque).
5. Vigilar que transcurra el tiempo de la tinción con el colorante emitiendo vapores, evitando a toda costa tener contacto con ellos.
6. Enjuagar la muestra con agua para eliminar el exceso de colorante
7. Añadir a la muestra safranina y dejarla actuar durante un minuto.

8. Enjuagar con abundante agua para eliminar el exceso de colorante.
9. Dejar secar la muestra al aire
10. Observar al microscopio y registrar resultados.

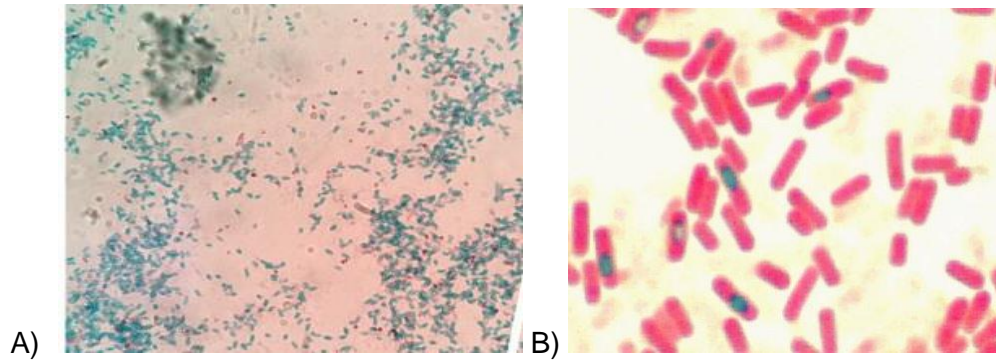


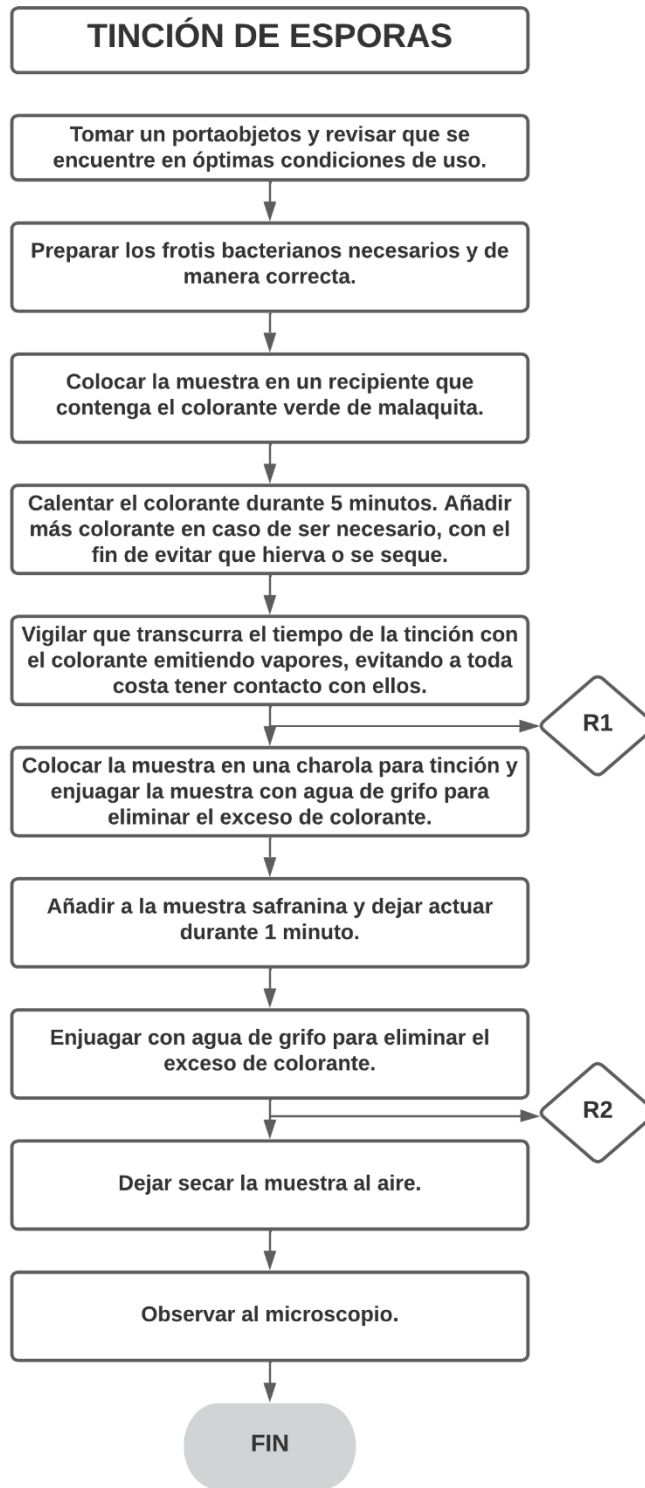
Figura 16. En la imagen A se puede observar la muestra de un cultivo de bacterias bucales y exosporas de color verde, así como unos bacilos de color rosado/rojo y en la imagen B se observa un acercamiento a endosporas en color verde al interior de las células vegetativas de color rosa. Recuperada de: <https://bit.ly/3votr4q> y <https://bit.ly/2DY9iaY>

Componentes de la tinción

1. Verde de malaquita
2. Safranina

Tratamiento de residuos

Recolectar el R2 en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.



R1: El colorante verde malaquita se almacena en un recipiente debidamente etiquetado, con el fin de reutilizarlo las veces que sea necesario.
 R2: Calentar la mezcla de agua y safranina hasta reducir el volumen al mínimo y proceder a almacenar en un recipiente apropiado, que proteja del daño físico, mantener lejos de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para evitar confusiones y mezclas con otras sustancias.

Tabla 8. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Verde de malaquita	Corrosividad Toxicidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta para su reutilización las veces que se consideren necesarias
R2	Safranina	Corrosividad Toxicidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

11 TINCIÓN AZUL DE ALGODÓN

Murray (2007) afirma que:

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. (p. 1745-1747)

La tinción de azul de 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.

Fundamento

Ohi et al (2004) mencionan que:

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. (p. 23-34)

Una vez preparado el colorante, se debe de 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). (Figura 17).

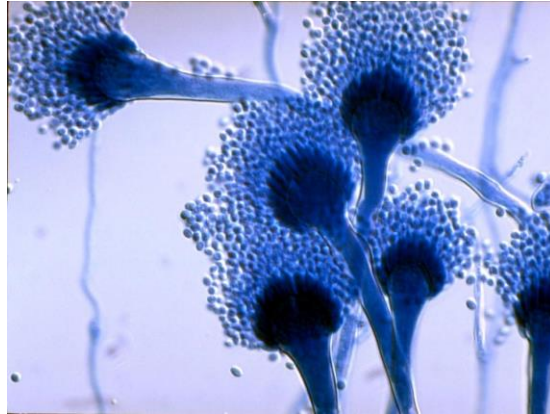


Figura 17. *Aspergillus spp.* observado al microscopio con tinción de azul de algodón de lactofenol, recuperada de: <https://bit.ly/3RoZrxK>

Procedimiento

1. Tomar un portaobjetos y revisar que se encuentre en óptimas condiciones de uso.
2. Seleccionar las colonias del medio de cultivo a las cuales se les realizará la tinción.
3. Cortar segmentos de cinta adhesiva transparente.
4. Colocar la en la punta de un asa bacteriológica.
5. Colocar una gota de azul de algodón en el portaobjetos.
6. Tocar la parte superior del micelio aéreo con la parte adhesiva de la cinta.
7. Colocar la cinta sobre la gota de azul de algodón del portaobjetos.
8. Colocar otra gota de azul de algodón.
9. Colocar un cubreobjetos sobre la preparación.
10. Observar al microscopio óptico.

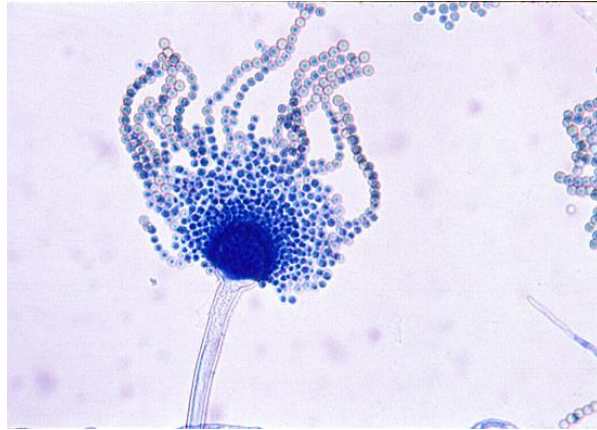


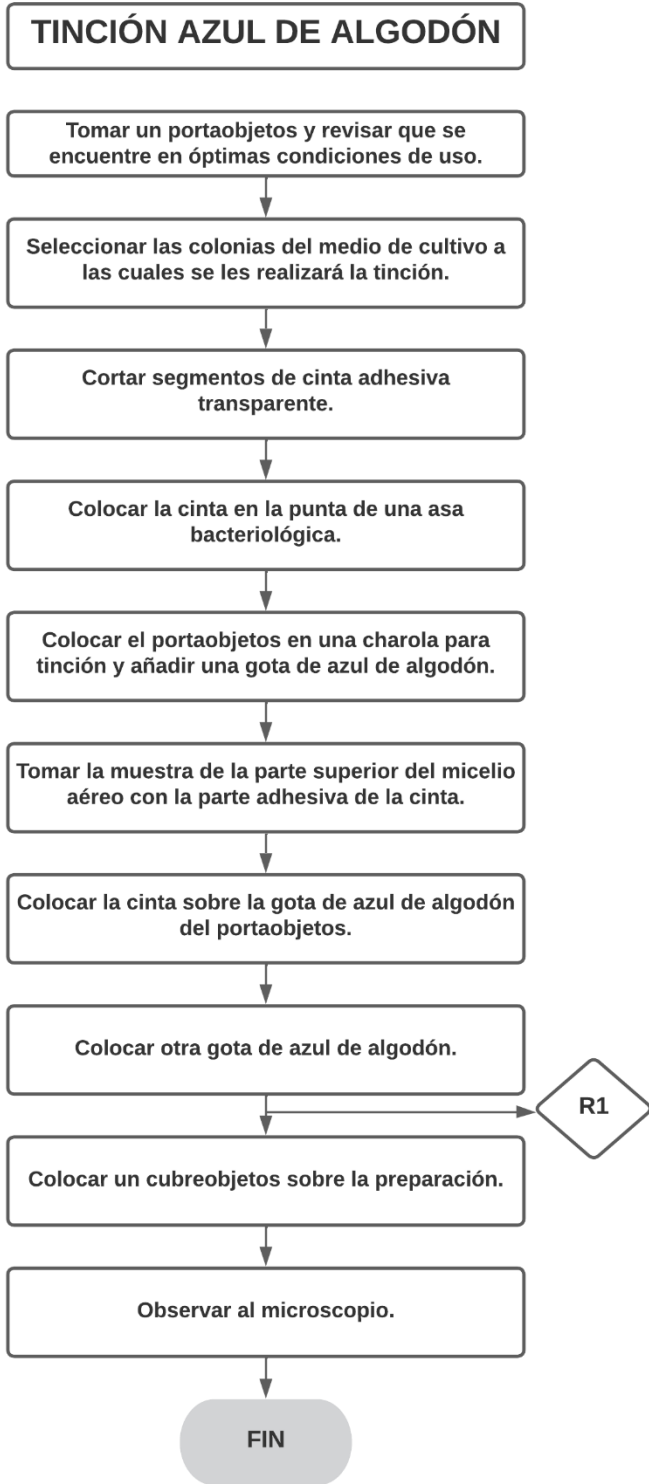
Figura 18. *Aspergillus flavus* observado al microscopio óptico con la tinción de azul de algodón, se logran observar algunas estructuras características de esta especie de hongo, como lo son: conidias, conidióforo, fiálides, hifas, etc. Recuperada de: <https://bit.ly/3R5tx9N>

Componentes de la tinción

1. Fenol
2. Ácido láctico
3. Azul de lactofenol

Tratamiento de residuos

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.



Todos los residuos se encuentran contenidos como una mezcla en la charola para tinción.
 R1: Calentar la mezcla hasta reducir el volumen al mínimo y proceder a almacenar en un recipiente apropiado que proteja del daño físico, mantener lejos de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para evitar confusiones y mezclas con otras sustancias.

Tabla 9. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Fenol, ácido láctico y azul de lactofenol	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

12 TINCIÓN NEGATIVA

Farrant (1954) menciona que:

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. (p. 569-576)

Ohi et al (2004) describen que:

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. (p. 23-34)

Fundamento

Mc K (1954) describe que:

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, 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. (p. 453-454)

Pueden producirse falsos positivos en presencia 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. 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.

Larone (2011) 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 cefalorraquídeo, 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 19). (p. 43-45)

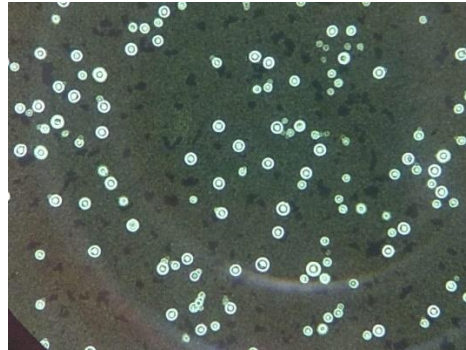


Figura 19. *Cryptococcus neoformans* observado al microscopio con tinción negativa con tinta china realizada en el laboratorio de la FESC-C1.

Procedimiento

1. Tomar un portaobjetos y revisar que se encuentre en óptimas condiciones de uso.
2. Tomar la muestra del medio de cultivo con ayuda de un asa bacteriológica.
3. Colocar la muestra en el centro del portaobjetos.
4. Añadir a la muestra una gota de tinta china.
5. Colocar un cubreobjetos.
6. Observar la preparación al microscopio óptico.

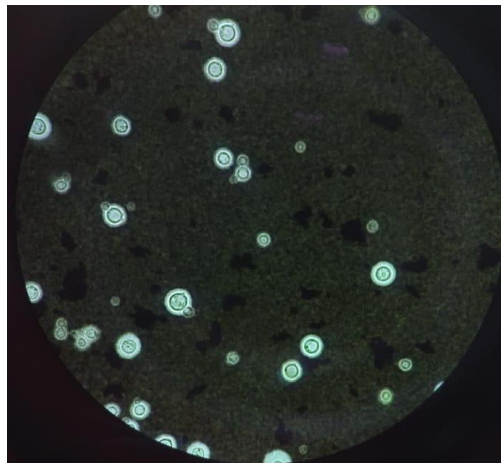


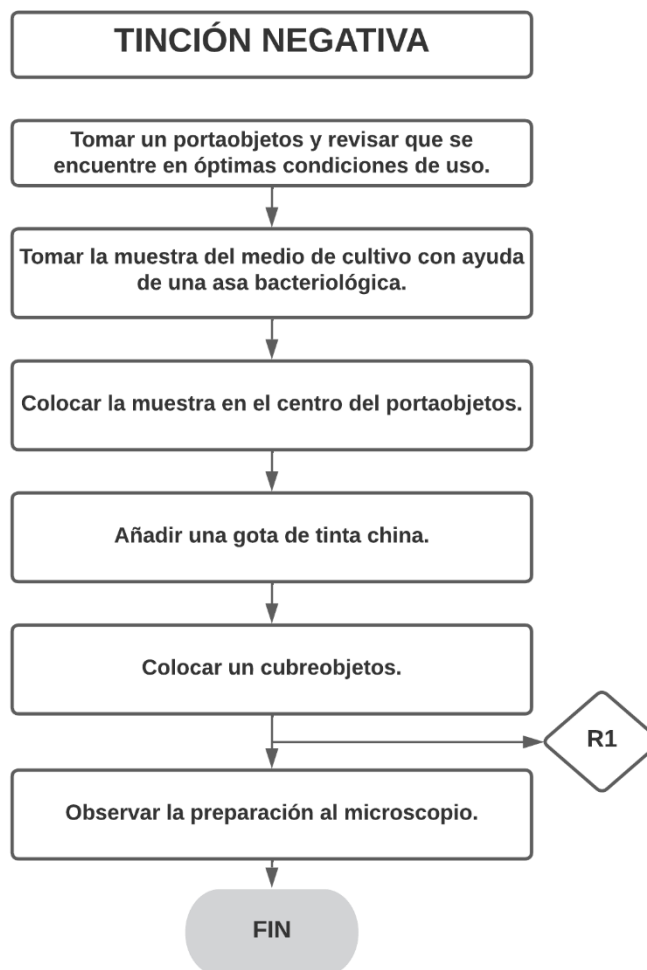
Figura 20. *En la imagen se observan capsulas de levaduras, gracias a la acción de la tinta china, las levaduras no permiten la penetración del colorante, por lo que se observa la luz del microscopio óptico atravesar dichas estructuras, el colorante funge como contraste. Imagen realizada en la FESC-C1.*

Componentes de la tinción

1. Tinta china
2. Nigrosina

Tratamiento de residuos

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.



R1: La tinta china o nigrosina no se considera un residuo peligroso, por lo cual se puede realizar la recolección de la tinta o nigrosina sobrante en un frasco protegido de la luz, correctamente etiquetado, para después ser entregado al personal encargado de la recolección de residuos de la FES-C. Su disposición final la determinará el personal encargado de su recolección.

Tabla 10. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Tinta china o nigrosina	Toxicidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

13 TINCIÓN CON LUGOL

Sánchez (2013) menciona que:

La disolución acuosa de yoduro potásico y yodo se utiliza en Biología, Bioquímica, Medicina y Química; sin embargo, en los libros y en los catálogos de Química figura como disolución yodurada de yodo o disolución acuosa de yodo, mientras que en los libros de las otras ciencias citadas sí aparece como reactivo de Lugol. Suponemos que esto se explica porque el descubrimiento se debe a un médico y primero se utilizó en Medicina y en Biología.

En la actualidad, la disolución acuosa de yodo utilizando yoduro de potasio aparece en todos los catálogos de productos químicos, aunque, como ya hemos indicado, muy pocas veces aparece el nombre de Reactivo o Licor de Lugol, que sigue siendo de amplia utilización en este momento y entre los usos destacaríamos: (p. 31-36)

Tabla 11. *Diferentes aplicaciones de la solución de Lugol.*

Tratamiento de enfermedades relacionadas con la glándula tiroides
Como indicador en la presencia de almidón
Para teñir el núcleo de las células y hacerlo más visible
Para la conservación de fitoplancton
Se utiliza en la biopsia para detectar cáncer vaginal
Se usa en acuarios como fuente de yodo y yoduro
Se utiliza como desinfectante
Es un oxidante débil pero muy selectivo

Fundamento

Sánchez (2013) describe que:

La molécula de yodo, I₂, está formada dos átomos de yodo unidos con enlace covalente y, como consecuencia de su carácter apolar, el yodo es prácticamente insoluble en agua, como ya indicaba Gay Lussac. Después de añadir agua sobre el yodo y comprobar que no se disuelve se le añade yoduro potásico que se une con el yodo formando el compuesto KI₃ que ya

es soluble en agua porque tiene carácter iónico (formado por el catión potasio y el anión triyoduro), y dando una disolución de coloración rojiza que es lo que se conoce como reactivo de Lugol o “disolución yodurada de yodo” y que tiene aplicaciones muy diversas. La preparación de la disolución de Lugol suele consistir en 5 g de I₂ y 10 g de KI diluidos con 85 mL de agua destilada, dando una disolución marrón con concentración total de yodo de 150 mg/mL. (p. 31-36)

Procedimiento

1. Tomar un portaobjetos y revisar que se encuentre en óptimas condiciones de uso.
2. Colocar la muestra en el centro del portaobjetos.
3. Añadir 2 o 3 gotas de reactivo de Lugol y dejar actuar durante 1 minuto.
4. Lavar con agua el exceso de Lugol.
5. Colocar un cubreobjetos.
6. Observar al microscopio.

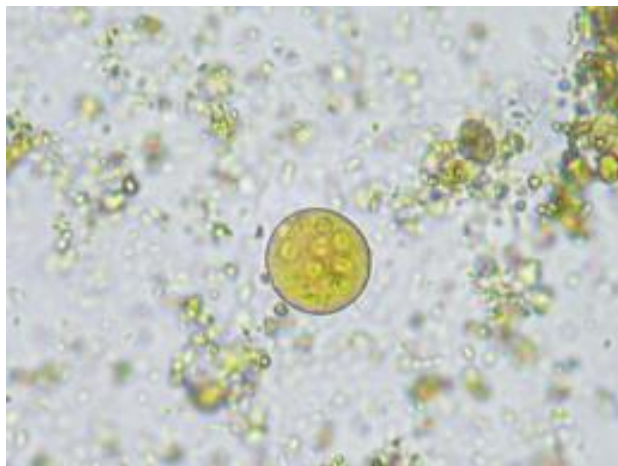


Figura 21. *Quiste teñido con Lugol observado al microscopio óptico. Recuperada de: <https://bit.ly/3cwdaUV>*

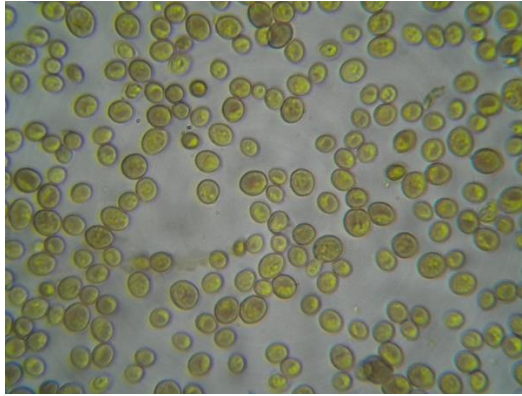


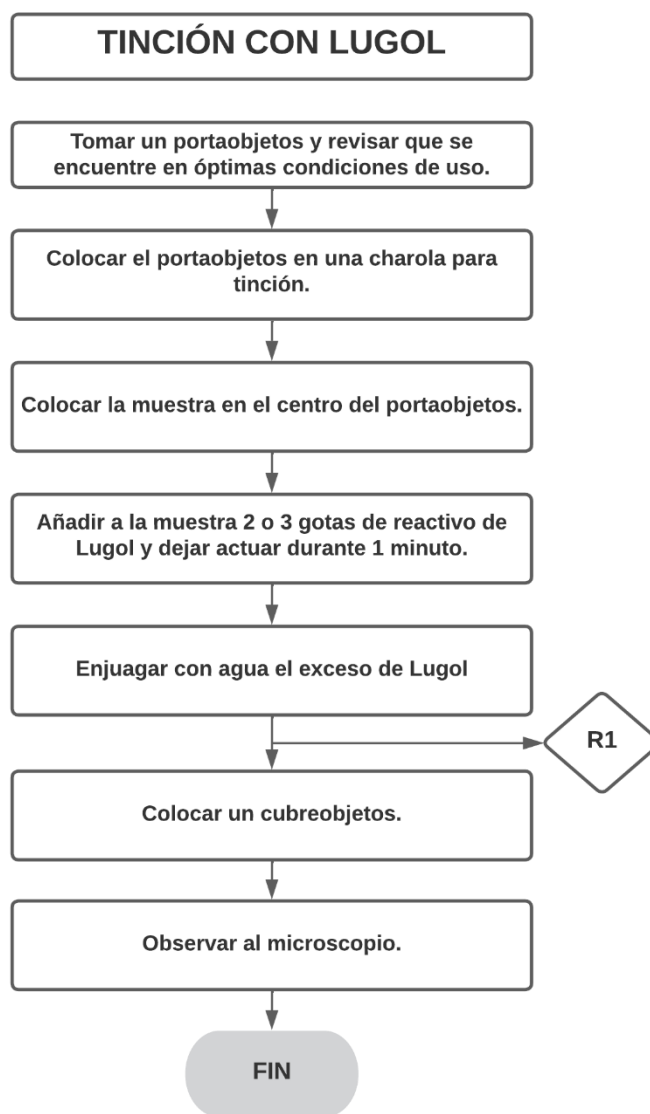
Figura 22. *Levaduras teñidas con Lugol, se pueden observar estructuras de diferentes tamaños, debido a que algunas se encuentran en proceso de gemación. Las distintas tonalidades ocreas en el citoplasma indican la presencia de gránulos de glucógeno.*
Recuperada de: <https://bit.ly/2JhcD8u>

Componentes de la tinción

1. Agua destilada.
2. Yodo molecular.
3. Yoduro potásico.

Tratamiento de residuos.

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.



R1: El reactivo de Lugol se encuentra contenido en una charola para tinción, proceder a almacenar en un recipiente apropiado que proteja del daño físico, mantener lejos de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para evitar confusiones y mezclas con otras sustancias.

Tabla 12. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Yodo molecular y yoduro potásico	Corrosividad Toxicidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

14 TINCIÓN DE KINYOUN

La tinción de Kinyoun es una variante de la tinción clásica de Ziehl-Neelsen que utiliza como colorante primario Fucsina básica con fenol a concentraciones altas, lo que permite la coloración en frío, mientras que la tinción clásica de Ziehl-Neelsen precisa la utilización de calor en la etapa de la coloración primaria. El resto de las etapas del procedimiento son las mismas que en la metodología original de Ziehl. Como colorante de contraste se utiliza Verde brillante, aunque también puede utilizarse Azul de Metileno.

La tinción de Ziehl-Neelsen se utiliza para la diferenciación de los microorganismos ácido-alcohol resistentes. Estos microorganismos poseen una pared celular lipídica especial, que contiene entre otros ácidos micólicos, que les permite resistir la decoloración con ácido-alcohol después de la tinción con colorantes básicos como la fucsina y aparecen de color rosa-rojizo, mientras que el resto de los microorganismos se tiñe con el colorante de contraste. Se supone que la permeabilidad a través de las membranas intactas puede ser un componente importante del mecanismo involucrado en el fenómeno de resistencia a la decoloración por alcohol ácido indicado.

Aunque el mecanismo de la diferenciación no está plenamente establecido, el método está totalmente aceptado como procedimiento diagnóstico de sospecha precoz, así como para proporcionar información sobre el número de microorganismos presentes en la muestra.

Los microorganismos ácido-alcohol resistentes son básicamente las Mycobacterias, aunque existen otros microorganismos que también presentan esta característica como son el género *Nocardia* y algunos parásitos como *Cryptosporidium*. (Figura 23). (Química Clínica Aplicada, 2016)

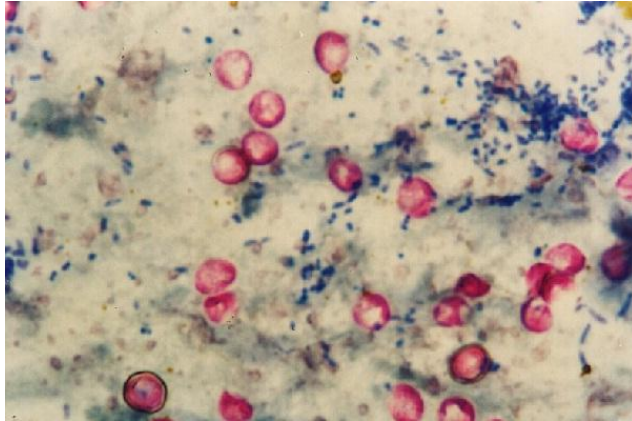


Figura 23. *Muestra teñida con la tinción de Kinyoun. Recuperada de: <https://bit.ly/2mzs0Qc>*

Procedimiento

1. Tomar un portaobjetos y revisar que se encuentre en óptimas condiciones de uso.
2. Realizar el frotis correspondiente.
3. Cubrir la muestra con fucsina fenicada y dejar actuar durante 5 minutos. (No calentar).
4. Enjuagar la muestra suavemente con agua corriente.
5. Eliminar el exceso de agua.
6. Añadir solución decolorante y dejar actuar durante 3-5 segundos. (Etanol 97% y HCl 3%).
7. Enjuagar con agua corriente.
8. Eliminar el exceso de agua.
9. Añadir colorante verde brillante o azul de metileno y dejarlo actuar durante 1 minuto.
10. Decantar el exceso de colorante y dejar secar.
11. Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

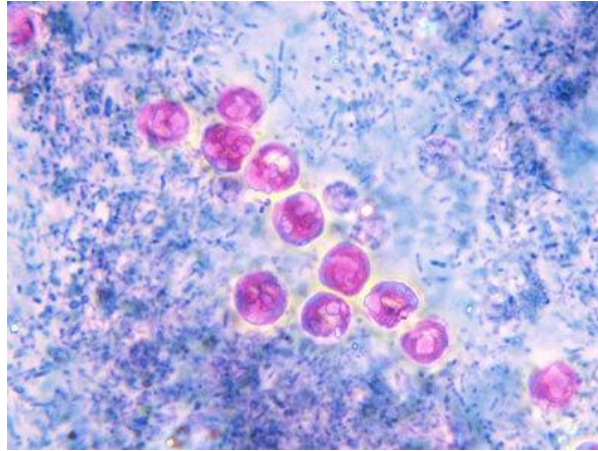


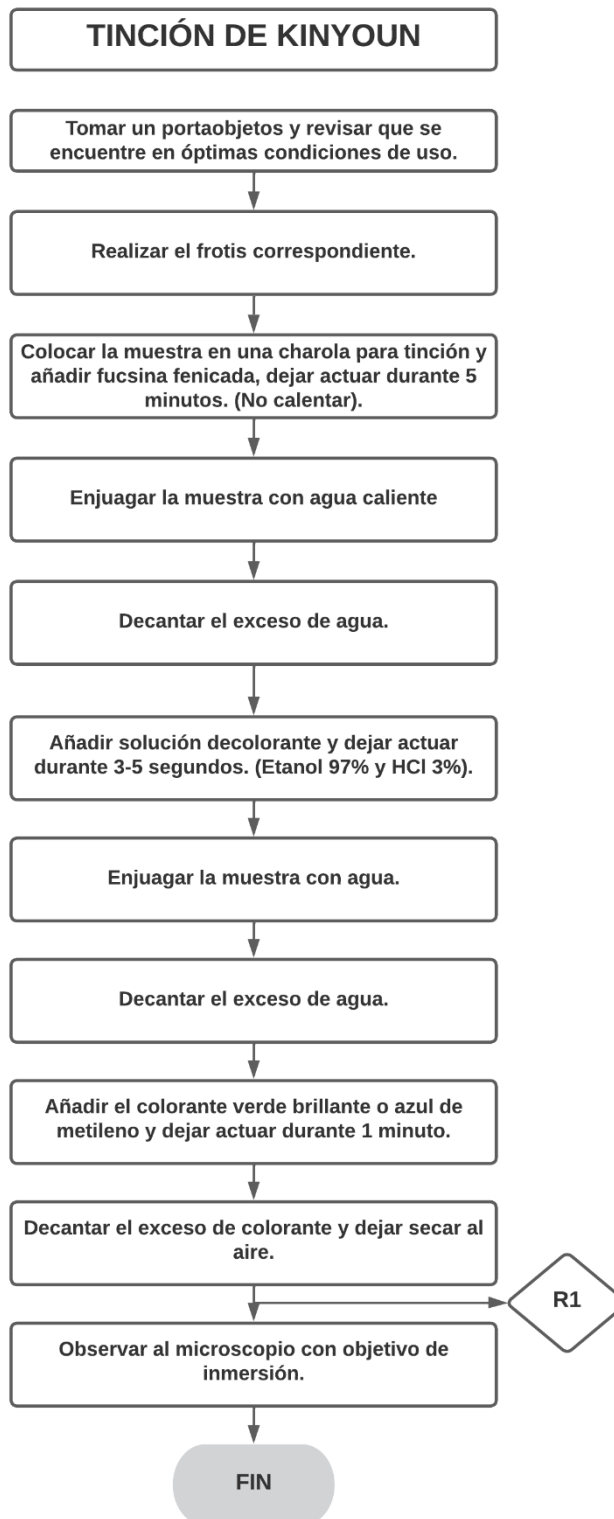
Figura 24. *Cyclospora cayetanensis* muestra teñida usando la tinción de Kinyoun, en la imagen se observa una muestra positiva en la cual se observan los quistes en color rosado. Bacilos ácido-alcohol resistentes: rojo oscuro a rosa. Bacilos no ácido-alcohol resistentes: verde pálido o azul, según el colorante utilizado. Recuperada de: <https://bit.ly/3AYvj73>

Componentes de la tinción

1. Fucsina fenicada.
2. Etanol.
3. HCl.
4. Verde brillante o azul de metileno.

Tratamiento de residuos

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de forma correcta.



Todos los residuos se encuentran contenidos como una mezcla en la charola para tinción.
 R1: Calentar la mezcla hasta reducir el volumen al mínimo y proceder a almacenar en un recipiente apropiado que proteja del daño físico, mantener lejos de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para evitar confusiones y mezclas con otras sustancias.

Tabla 13. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Fucsina fenicada, etanol, HCl, verde brillante o azul de metileno	Corrosividad Reactividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

15 TINCIÓN DE WRIGHT

Koneman (2006) menciona que:

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.

Mientras que, Forbes et al (2009) describen que:

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.

Fundamento

Forbes et al (2009) mencionan que:

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.

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. (p. 342-348)

Forbes et al (2009) afirman que:

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 fundamenta 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.

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. (p. 342-348)

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 25).

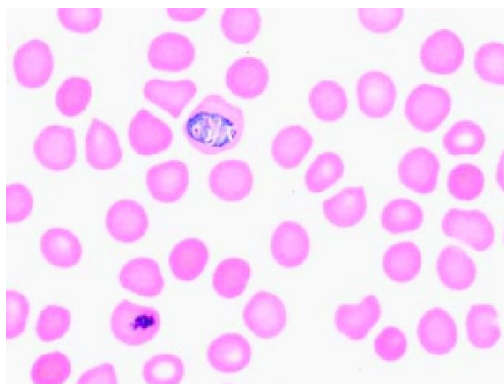


Figura 25. Trofozoítos de Plasmodium vivax con tinción de Wright recuperada de: <https://bit.ly/3COLUf1>

En la imagen se puede observar la coloración típica de esta tinción, el citoplasma de las células se observa de un color rosado, mientras que los núcleos celulares se observan de color azul-morado.

En micología esta tinción es de gran ayuda en la búsqueda de Histoplasma capsulatum (hongo dimórfico) en extendidos de médula ósea.

Procedimiento

1. Tomar un portaobjetos y revisar que se encuentre en óptimas condiciones de uso.
2. Realizar en el portaobjetos un extendido de la muestra.
3. Fijar la muestra con calor (mechero).
4. Colocar el frotis seco sobre el puente de coloración.
5. Añadir al frotis el colorante de Wright y dejar actuar durante 5-8 minutos (el colorante deberá cubrir toda la muestra, evitando que se escurra por los bordes del portaobjetos).
6. Añadir solución amortiguadora y dejarla actuar durante 10-15 minutos.
7. Enjuagar con agua el exceso de colorante y soln amortiguadora.
8. Dejar secar el frotis al aire.
9. Observar al microscopio con aceite de inmersión.

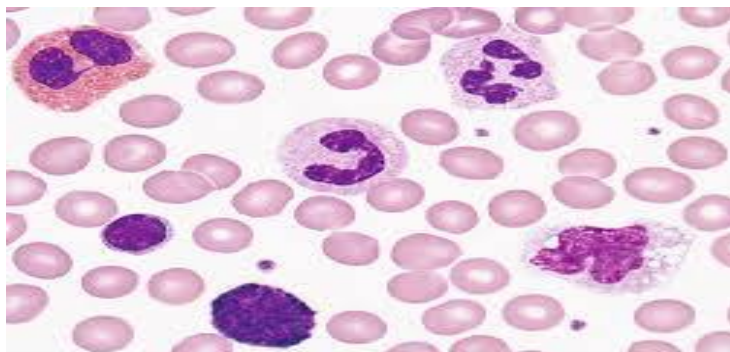


Figura 26. *Glóbulos blancos observados al microscopio con tinción de Wright recuperada de: <https://bit.ly/3ACzCUe>*

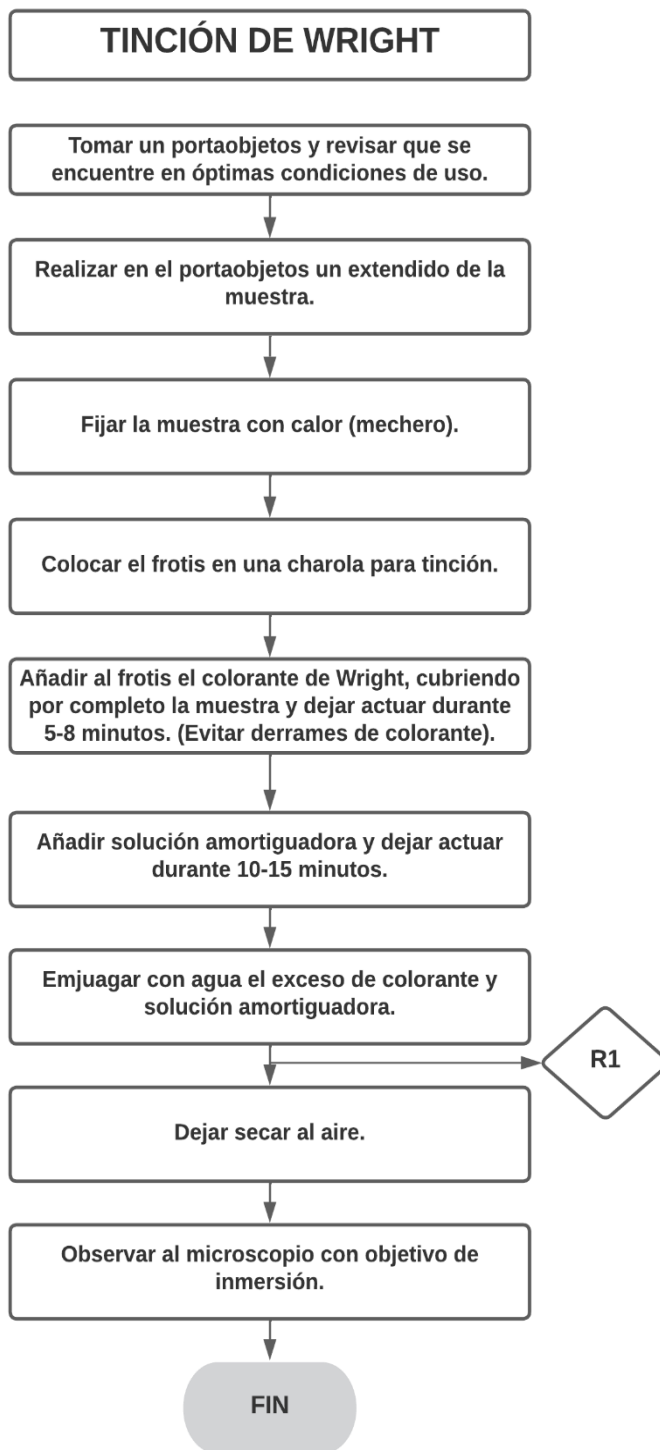
En la imagen se puede observar la coloración característica de esta tinción, se observan de color morado los núcleos de los glóbulos blancos (células presentes en la sangre), mientras que el citoplasma se tiñe de un color rosado-anaranjado.

Componentes de la tinción

1. Metanol.
2. Solución amortiguadora.
3. Eosina (Y).
4. Azul de metileno.

Tratamiento de residuos

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.



Todos los residuos se encuentran contenidos como una mezcla en la charola para tinción.
 R1: Calentar la mezcla hasta reducir el volumen al mínimo y proceder a almacenar en un recipiente apropiado que proteja del daño físico, mantener lejos de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para evitar confusiones y mezclas con otras sustancias.

Tabla 14. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Metanol, solución buffer, eosina y azul de metileno	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

16 TINCIÓN DE GIEMSA

La tinción de Giemsa es un tipo de coloración de muestras clínicas (tejidos, sangre), basada en la mezcla de colorantes ácidos y básicos. La creó Gustav Giemsa, químico y bacteriólogo alemán, que perfeccionó el trabajo de Romanowsky agregando glicerol para estabilizar los compuestos. Los cambios generados a la técnica original de Romanowsky permitieron mejorar considerablemente las observaciones microscópicas, por ello, la técnica fue bautizada con el nombre de tinción de Giemsa. Por ser una técnica sencilla de realizar, de gran funcionalidad y económica, es actualmente muy utilizada en el laboratorio clínico para frotis hematológicos, muestras de médula ósea y cortes de tejido.

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, distinguiéndose incluso finas trazas de cromatina. Además, se pueden detectar cambios significativos en el tamaño, forma o coloración del núcleo, donde es posible visualizar la pérdida de la relación núcleo-citoplasma. (Lifeder, 2022)

Fundamento

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

En este mismo sentido, las estructuras básicas de las células son la hemoglobina y algunos gránulos, como los contenidos en los segmentados eosinófilos, entre otras. Estos serán teñidos con eosina.

Por otra parte, debido a aquel azul de metileno y el azure se caracterizan por ser colorantes metacromáticos, pueden brindar una tonalidad variable a distintas estructuras, de acuerdo con la carga de polianiones que posean. Es así como la combinación estratégica de colorantes básicos y ácidos logran desarrollar un amplio espectro de colores, de acuerdo con las características bioquímicas de cada estructura, paseándose por tonalidades azules pálidos, azules oscuros, lila y púrpura, en el caso de las estructuras ácidas. La coloración que brinda la eosina es más estable, generando colores entre rojizo, naranja y salmón. (Figura 27). (Lifeder, 2022)

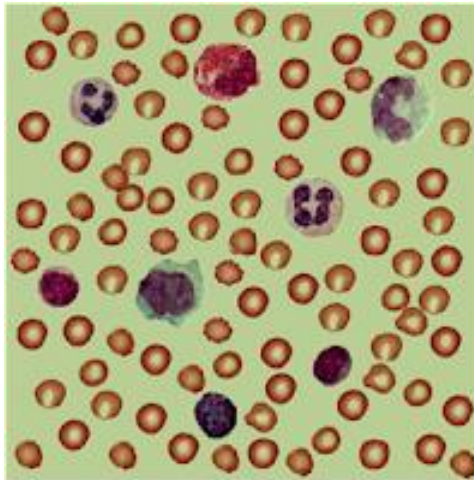


Figura 27. Frotis sanguíneo teñido con la tinción de Giemsa, en el cual se pueden observar eritrocitos, basófilos, eosinófilos, polimorfonucleares, linfocitos, plaquetas y la cromatina de los núcleos. Recuperada de: <https://bit.ly/3cGPmh2>

Procedimiento

1. Tomar un portaobjetos y revisar que se encuentre en óptimas condiciones de uso.
2. Realizar un frotis sanguíneo y dejar secar.
3. Colocar la muestra en una charola para tinción.
4. Cubrir la muestra con metanol y dejar actuar durante 3 minutos.
5. Enjuagar la muestra con agua corriente.

6. Añadir el colorante de Giemsa, la solución amortiguadora y dejar actuar durante 25 minutos. (0.2 mL de Giemsa + 2 mL de solución amortiguadora).
7. Enjuagar la muestra con agua corriente.
8. Eliminar el exceso de agua.
9. Dejar secar al aire.
10. Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

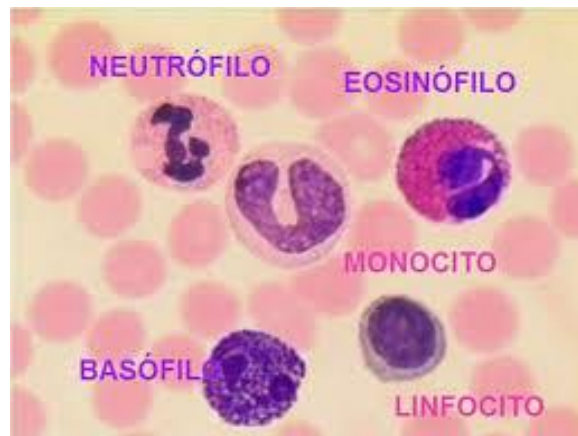


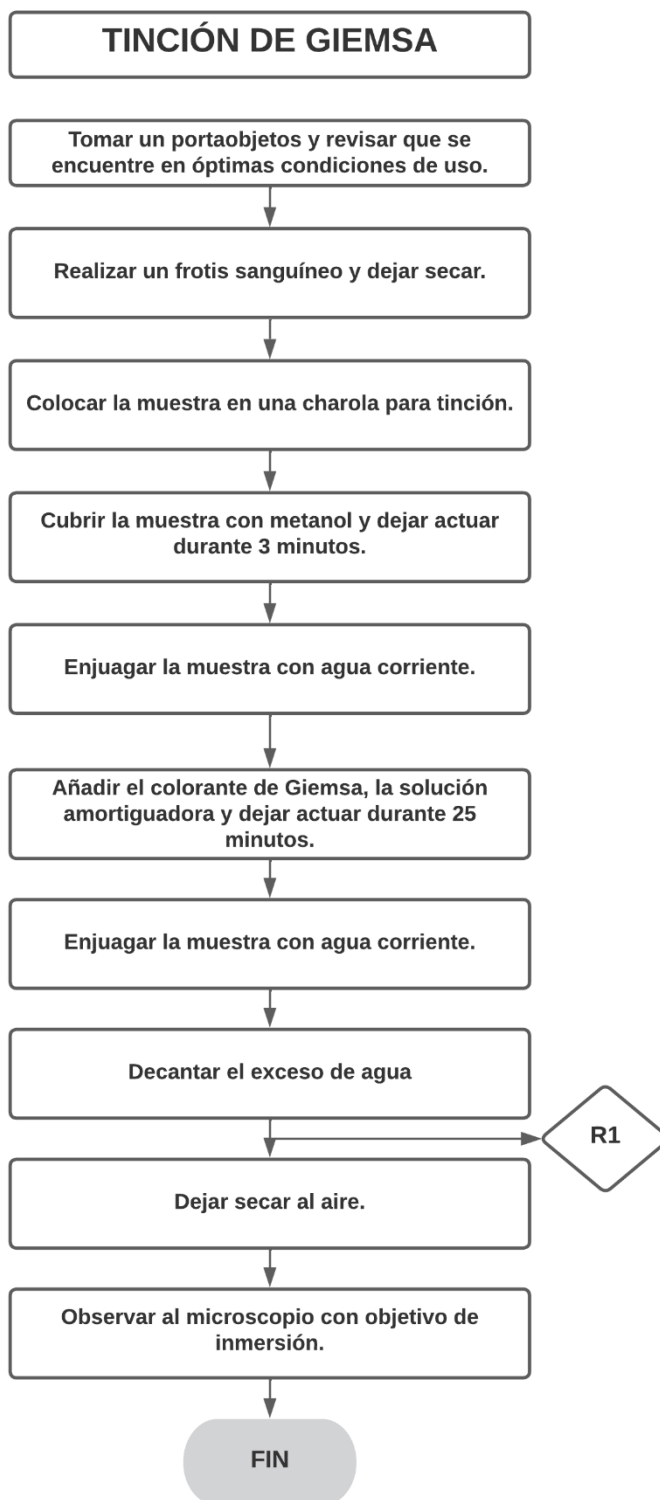
Figura 28. En la imagen se pueden observar células sanguíneas teñidas con la tinción de Giemsa, observando los colores característicos de dicha tinción. Recuperada de: <https://bit.ly/3TCaplt>

Componentes de la tinción

1. Metanol
2. Colorante de Giemsa.
3. Solución amortiguadora pH 7.2

Tratamiento de residuos

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.



Todos los residuos se encuentran contenidos como una mezcla en la charola para tinción.
 R1: Calentar la mezcla hasta reducir el volumen al mínimo y proceder a almacenar en un recipiente apropiado que proteja del daño físico, mantener lejos de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para evitar confusiones y mezclas con otras sustancias.

Tabla 15. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Metanol. Colorante de Giemsa y solución buffer	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

17 TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

La tinción de hematoxilina – eosina es una técnica de coloración que utiliza la combinación de los colorantes hematoxilina y eosina. Este par de colorantes hacen un dúo perfecto, ya que la hematoxilina actúa como un colorante básico y la eosina es un colorante ácido. La designación de colorantes básicos o ácidos no se refiere al pH que obtienen en solución, sino más bien habla de la proporción que prevalece en cuanto a las cargas aniónicas o catiónicas que poseen o por la ubicación del grupo cromóforo.

En este sentido, la hematoxilina es considerada un colorante básico (catiónico) y por ello tiene afinidad por las estructuras ácidas, como por ejemplo el núcleo de las células. Mientras que la eosina al ser un colorante ácido (aniónico) tiene afinidad por las estructuras alcalinas o básicas, como el citoplasma celular. (Lifeder, 2022)

Fundamento

Método de tinción de rutina en histología y citología. Es una tinción basada en dos etapas, la primera una tinción nuclear por un colorante básico (hematoxilina) y la segunda, una tinción citoplasmática por un colorante xantenico ácido (eosina). La hematoxilina en combinación con sales de aluminio, hierro o cromo, forma un colorante activo, la hemateina, formada por oxidación de la hematoxilina. Este se usa como colorante nuclear, tiñendo los núcleos de color azul/negro y aportando un buen detalle de los mismos. Por este motivo, se suele usar junto con un colorante citoplasmático, generalmente la eosina, que aporta una gradación entre el rosa, y el rojo a las estructuras y matrices celulares de carácter catiónico (a las que la hematoxilina no tiñe o lo hace muy débilmente). Se consigue así un buen contraste de las preparaciones microscópicas facilitando su observación.

La hematoxilina es un colorante neutro. Sin embargo, el componente que proporciona el color (cromóforo) está ubicado en el centro catiónico o básico de la molécula. De allí su afinidad por las estructuras ácidas. Tiñe principalmente los

núcleos de las células, ya que estos son muy ricos en ácidos nucleicos. También puede teñir inclusiones citoplasmáticas de origen viral.

La eosina es un colorante que tiñe de color rojo o rosado. Es insoluble en agua, aunque hay una versión hidrosoluble. Generalmente, la eosina se prepara disolviendo en alcohol (etanol al 95°). Tiñe citoplasmas, fibras musculares, organelos citoplasmáticos y colágeno, pero no tiñe los núcleos celulares. Esto es debido a que se encuentra cargada de forma negativa, por tanto, tiene afinidad por las estructuras cargadas positivamente.

Existen dos tipos de eosina la “Y” y la “B”. La eosina “Y” se le conoce como eosina amarilla. Tiene la propiedad de distinguir entre una célula viva y una muerta, pues solo es capaz de atravesar la membrana para teñir su citoplasma cuando las células están muertas, quedando el citoplasma de la célula incolora si esta permanece viva. (Figura 29). (Lifeder, 2022)

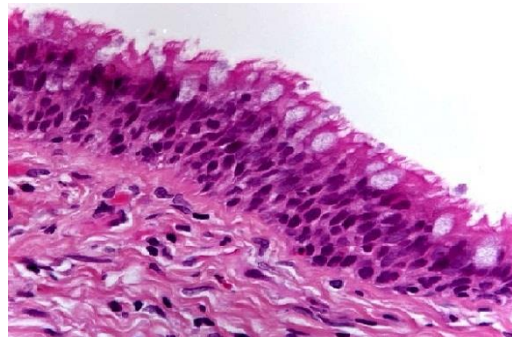


Figura 29. Epitelio cilíndrico ciliado observado al microscopio teñido con Hematoxilina-Eosina, recuperada de: <https://bit.ly/3qcEPNU>

Procedimiento

La tinción de cortes histológicos pasa por una serie de pasos. Lo primero es la obtención del corte histológico. Este debe ser parafinado para luego obtener los cortes (ultrafinos) con un micrótomo. La técnica consta de los siguientes pasos:

1. Eliminar el exceso de parafina sumergiendo la muestra en xilol durante 3-5 minutos.

2. Sumergir la muestra en alcohol a diferentes concentraciones en orden decreciente (100°, 90° y 70°) durante 7 minutos en cada solución.
3. Eliminar el exceso de alcohol sumergiendo la muestra en agua destilada durante 7 minutos.
4. Sumergir la muestra en hematoxilina durante 6-10 minutos.
5. Eliminar el exceso de colorante lavando la muestra con agua durante 5 minutos.
6. Sumergir la muestra durante 10-20 segundos en alcohol ácido.
7. Sumergir la muestra en eosina durante 5 minutos.
8. Deshidratar la muestra sumergiéndola en alcohol a diferentes concentraciones en orden ascendente (70°, 90° y 100°) durante 5 segundos, 5 segundos y 1 minutos respectivamente.
9. Sumergir la muestra en xilol durante 5-10 minutos y dejar secar.
10. Sellar la muestra con resina.

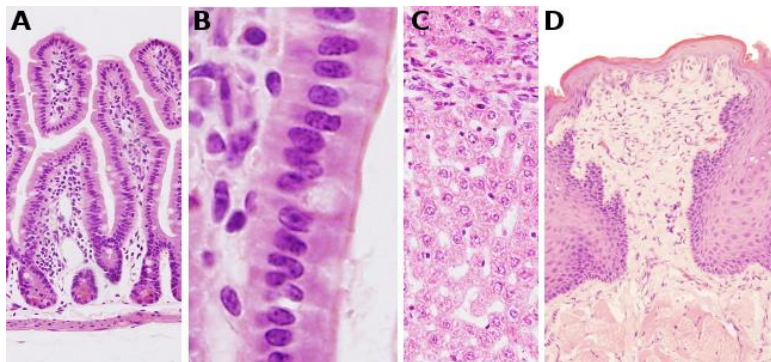


Figura 30. Secciones de parafina de 8 μm de grosor teñidas con hematoxilina y eosina. A) Vellosidades del intestino delgado. B) Detalle del epitelio del digestivo. C) Hepatocitos. D) Papila fungiforme de la lengua, Imagen recuperada de: <https://bit.ly/3BcHSf9>

Componentes de la tinción

- 1- Hematoxilina.
- 2- Eosina.
- 3- Ácido acético glacial.

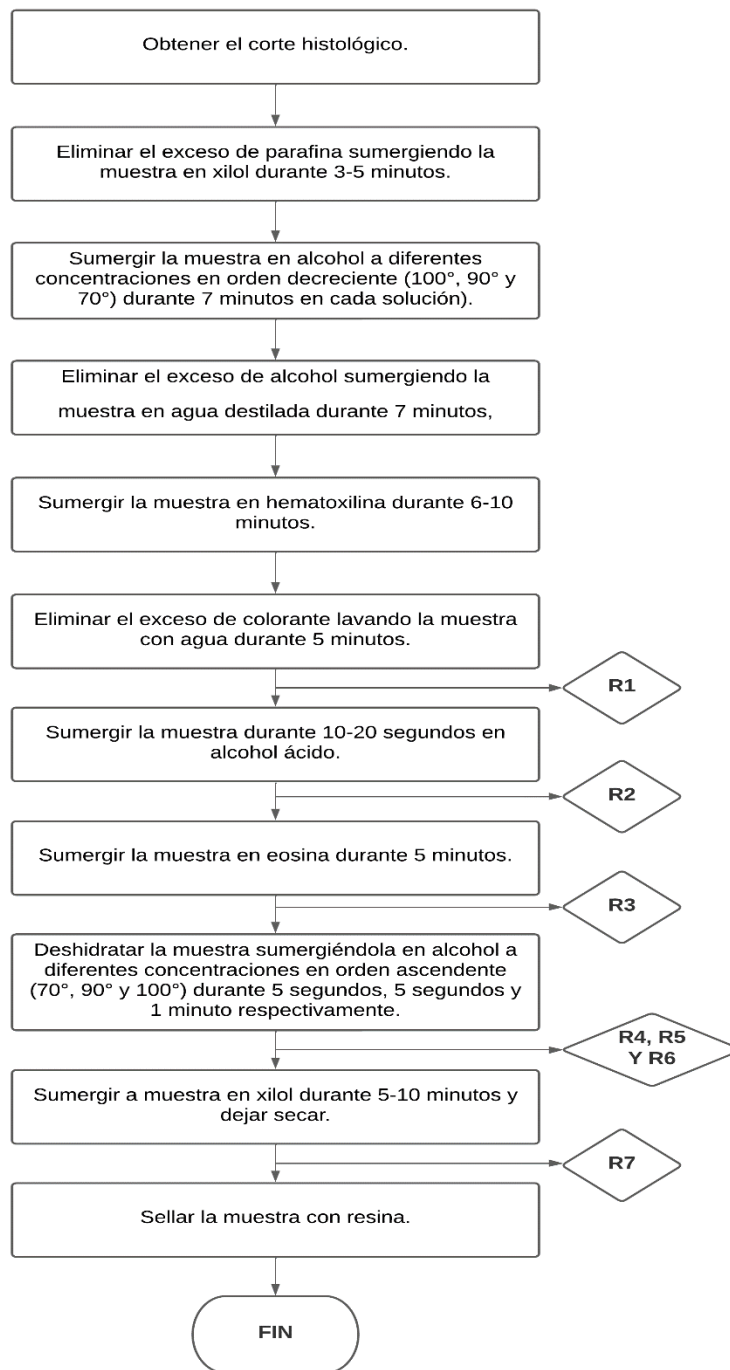
4- Xilol.

5- Etanol.

Tratamiento de residuos

Recolectar todos los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.

TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA



R1: Almacenar en un recipiente apropiado que proteja del daño físico, mantener lejos de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para evitar confusiones y mezclas con otras sustancias.

R2: Neutralizar con NaOH hasta obtener un pH entre 6-8, para así eliminarlo por el alcantarillado o en su defecto almacenar en un recipiente debidamente etiquetado para su disposición final.

R3: Almacenar en un recipiente apropiado y debidamente etiquetado, no existe un tratamiento específico por lo cual debe manejarse como un residuo peligroso.

R4, R5 y R6: Mezclar todos estos residuos en un recipiente y calentar hasta obtener un volumen mínimo o en su defecto hasta la eliminación total del mismo.

R7: Altamente tóxico y cancerígeno, se recomienda resguardarlo en un recipiente debidamente etiquetado para que su disposición final se logre por medio del personal encargado de los residuos en la FESC.

Tabla 16. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Xilol, alcohol (100, 90 y 70°) y hematoxilina	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R2	Alcohol ácido	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Neutralizar con NaOH hasta obtener un pH 6-8 y verterlo por el alcantarillado o en su defecto almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera adecuada
R3	Eosina	Toxicidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R4	Alcohol	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Calentar hasta eliminarlo por completo o en su defecto, almacenar el sobrante en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R5	Alcohol	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Calentar hasta eliminarlo por completo o en su defecto, almacenar el sobrante en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R6	Alcohol	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Calentar hasta eliminarlo por completo o en su defecto, almacenar el sobrante en un

			frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R7	Xilol	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

18 TINCIÓN DE EOSINÓFILOS

La tinción de May Grünwald-Giemsa o Pappenheim es una técnica de coloración diferencial que mezcla los reactivos Giemsa y May Grünwald. Es utilizada para la diferenciación de células sanguíneas normales y anormales en frotis de sangre periférica y médula ósea, así como para la tinción de cortes histológicos y muestras citológicas.

Ambos reactivos —Giemsa y May Grünwald— se derivan de la tinción tipo Romanowsky, técnica que está basada en la combinación de colorantes ácidos y básicos.

Giemsa mejoró la técnica al estabilizar la mezcla de eosina, azul de metileno y sus derivados, con glicerol. En cambio, May Grünwald utiliza eosina y azul de metileno, usando como solvente el metanol. Esta combinación estratégica ha dado excelentes resultados. Si bien en cuanto a la observación de morfología celular actúa de forma similar a las coloraciones de Giemsa y Wright, esta técnica mejora las anteriores afinando la coloración de los parásitos que causan el paludismo, el mal de Chagas, la leishmaniasis y la tricomoniasis.

Adicionalmente, ha mostrado ser una técnica muy útil para el estudio citológico del líquido espermático. Se ha destacado no solamente al mostrar las características morfológicas de los espermatozoides, sino que además permite diferenciar con gran eficacia los leucocitos, las células epiteliales y las células de la espermatogénesis. (Lifeder, 2022)

Fundamento

En esta técnica coexiste una combinación de reacciones entre los colorantes ortocromáticos y los metacromáticos. Los ortocromáticos (la eosina y el azul de metileno) se fijan a la estructura celular a la que son afines y proporcionan un color estable que no varía. En cambio, los metacromáticos (los derivados del azul de metileno azur A y azur B), varían su color original una vez unidos a la estructura específica, pudiendo incluso haber variedad de matices.

Finalmente, el paso que lleva la solución May Grünwald necesita la presencia de agua, pues sin este el colorante penetrará las estructuras, pero no se fijará. Para que ello ocurra el colorante debe volverse polar o ionizarse, y así ser capaz de precipitar y fijarse a las estructuras afines. (Figura 31). (Lifeder, 2022)

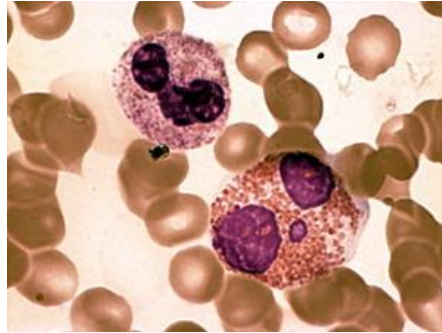


Figura 31. Muestra de sangre periférica teñida con la técnica de May Grünwald-Giemsa, observada al microscopio. Recuperada de: <https://bit.ly/3TTE6PI>

Procedimiento

1. Realizar un frotis de sangre periférica en un portaobjetos en condiciones adecuadas para su uso.
2. Cubrir el frotis con la solución de May Grünwald diluida durante 2-3 minutos.
3. Lavar la muestra con agua destilada tamponada.
4. Cubrir la muestra con agua destilada tamponada durante 1 minutos.
5. Añadir a la muestra 12 gotas de la solución de Giemsa diluida y dejar actuar durante 15-20 minutos.
6. Lavar la muestra con agua destilada tamponada.
7. Dejar secar al aire.
8. Observar al microscopio en 40 o 100x.

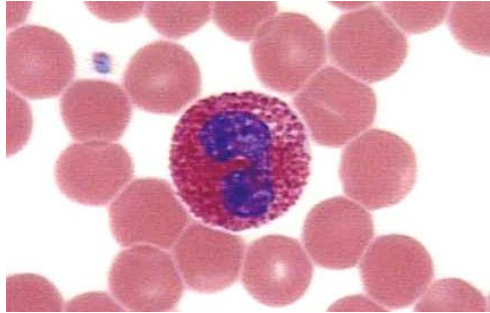


Figura 32. Muestra de sangre periférica teñida con la técnica de May Grünwald-Giemsa, en la cual se puede observar un eosinófilo con los colores característicos de dicha tinción, el núcleo se ve de color azul-violeta y las granulaciones de un color rojo ladrillo a pardo rojizo. Recuperada de: <https://bit.ly/3AP8l00>

Componentes de la tinción

1. Colorante May Grünwald.
2. Colorante de Giemsa.
3. Solución buffer con un pH de 7.2.

Solución May Grünwald

1. Pesar 0.25 gramos de eosina-azul de metileno y disolver en 100 mL de metanol.
2. Mezclar la solución durante 1 hora y dejar reposar durante 24 horas.
3. Filtrar la solución.

Para aplicar la técnica el colorante debe diluirse de la siguiente manera:

1. Medir 30 mL de la solución concentrada.
2. Agregar 20 mL de la solución buffer.
3. Agregar 150 mL de agua destilada ajustada a un pH de 7.2 - 7.3.

Solución Giemsa

1. Pesar 0.5 gramos de azur-eosina-azul de metileno y disolver en 50 mL de metanol.
2. Agregar a la mezcla 50 mL de glicerina.

Para aplicar a la técnica el colorante debe diluirse 1:10 con solución buffer.

Dejar reposar durante 10 minutos

Filtrar la mezcla de ser necesario.

Tratamiento de residuos

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.

TINCIÓN DE EOSINÓFILOS

Realizar un frotis de sangre periférica en un portaobjetos en condiciones adecuadas para su uso.

Colocar en una charola para tinción la muestra y cubrirla con la solución de May Grünwald diluida y dejar actuar durante 2-3 minutos.

Lavar la muestra con agua destilada tamponada.

Cubrir la muestra con agua tamponada durante 1 minuto.

Añadir a la muestra 12 gotas de solución de Giemsa diluida y dejar actuar durante 15-20 minutos.

Lavar la muestra con agua destilada tamponada.

R1

Dejar secar al aire.

Observar al microscopio a 40 o 100x.

FIN

Todos los residuos se encuentran contenidos como una mezcla en la charola para tinción.

R1: Calentar la mezcla hasta reducir el volumen al mínimo y proceder a almacenar en un recipiente apropiado que proteja del daño físico, mantener lejos de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para evitar confusiones y mezclas con otras sustancias.

Tabla 17. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Colorante de May-Grünwald, Colorante de Giemsa y solución buffer	Toxicidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

19 TINCIÓN DE RETICULOCITOS

Arribas (2005) menciona que:

Los reticulocitos son eritrocitos inmaduros presentes en sangre periférica, lugar donde terminan su maduración a hematíes. Contienen restos de ARN y ribosomas que precipitan en presencia de los colorantes vitales como el azul de metileno o el azul de cresil brillante. En los reticulocitos incubados con el colorante se ven imágenes gránulo-filamentosas identificables con el microscopio óptico, que corresponden a los restos de ARN. El recuento de reticulocitos puede realizarse mediante método manual o por citometría de flujo. (p. 207-210)

Fundamento

Arribas (2005) describe que:

El azul cresil brillante, como un colorante supravital, que tiñe los RNA residual, ribosomas y mitocondrias precipitados en los eritrocitos inmaduros. Se cuentan los glóbulos rojos con retículo teñido y el resultado se expresa como porcentaje del número de glóbulos examinados.

Si se utiliza Citometría de Flujo el colorante a utilizar es "Tiazol Orange" o Naranja de Acridina que marcan el RNA, este método es de mayor significancia estadística ya que permite contar un número mayor de células y posee una mayor sensibilidad. (Figura 33). (p. 207-210)

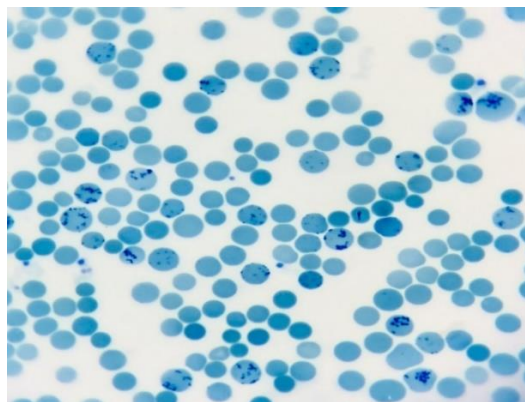


Figura 33. Recuento de reticulocitos observado al microscopio óptico con inmersión y tratado con azul de cresil brillante. Recuperada de: <https://bit.ly/3CT6n2g>

Procedimiento

1. Realizar una venopunción para obtener la muestra de sangre periférica (tubo con EDTA).
2. Verter en un tubo de ensayo pequeño 3 gotas de sangre con EDTA.
3. Agregar 3 gotas de azul de cresil brillante.
4. Mezclar el tubo y tapar con Parafilm.
5. Incubar en baño María a 37° C durante 10 minutos.
6. Realizar un frotis en un portaobjetos.
7. Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

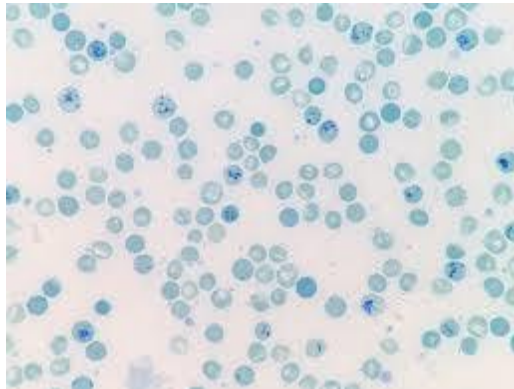


Figura 34. Muestra de sangre teñida con azul de cresil brillante, se puede observar en la imagen A en un color azul los restos de RNA en el citoplasma de los hematíes, Recuperada de: <https://bit.ly/3CX0dhv>

Componentes de la tinción

1. Solución salina isotónica.
2. Azul de cresil brillante.

Preparación de las soluciones

Solución salina isotónica:

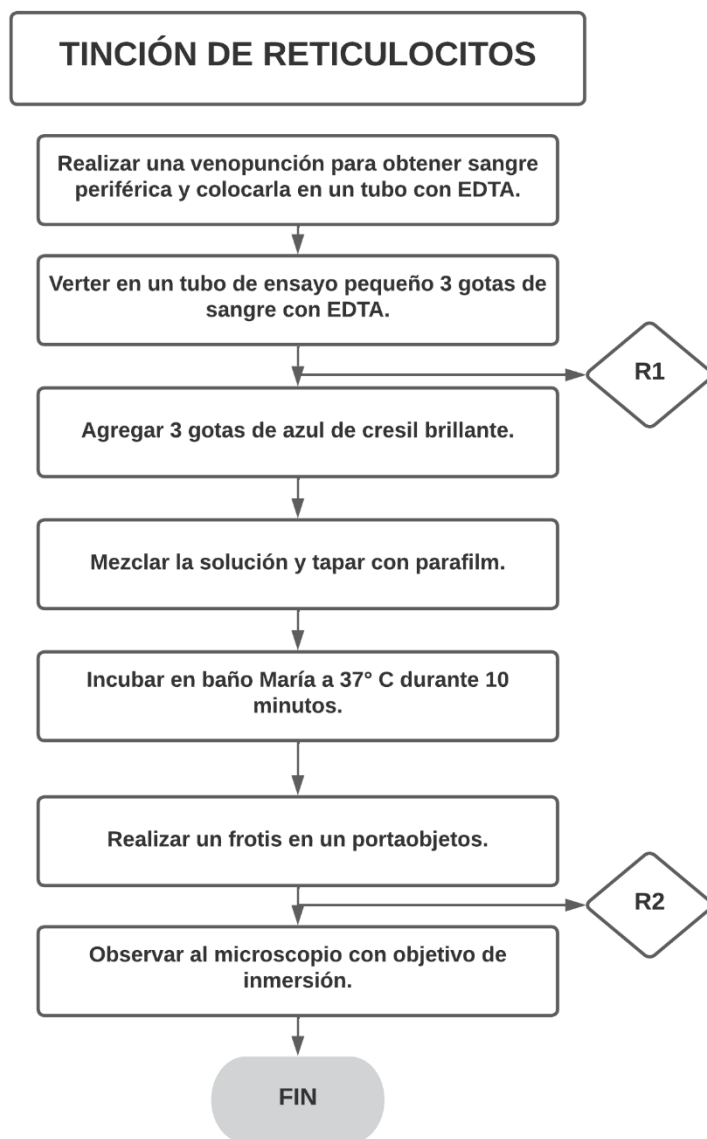
1. Pesar 8.5 gramos de cloruro de sodio.
2. Mezclar con 991.5 mL de agua destilada.

Azul de cresil brillante:

1. Pesar 1.5 gramos de azul de cresil brillante.
2. Mezclar con 100 mL de solución salina isotónica.

Tratamiento de residuos

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.



R1: Disponer del tubo como un RPBI.
 R2: Disponer del resto de la mezcla como un RPBI.
 Después de observar la muestra al microscopio, disponer de la misma como un RPBI.

Tabla 18. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Sangre periférica	Biológico-infeccioso	Manejar como lo indica el tratamiento

			de RPBI
R2	Frotis sanguíneo	Biológico-infeccioso	Manejar como lo indica el tratamiento de RPBI

20 TINCIÓN DE MIELOPEROXIDASA

Son específicas de la serie mieloide. La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima lisosómica localizada en los gránulos azurófilos de los neutrófilos y monocitos. En la serie granulocítica dichos gránulos corresponden a los gránulos primarios. En la serie monocítica son más pequeños y no son los primeros en aparecer durante la maduración en estas células, por lo que la denominación de primarios es inapropiada. La MPO también puede ser demostrada en los gránulos específicos de los eosinófilos y basófilos. En el eosinófilo los gránulos específicos derivan de los gránulos primarios, los cuales son MPO positivos, y esta enzima es química e inmunológicamente distinta de la neutrófila. Las peroxidasas granulocíticas comprenden 2 enzimas:

- a) la neutrófila: se encuentra en estos elementos y en los monocitos y basófilos positivos, y se caracteriza por ser sensible al cianuro de potasio.
- b) la eosinófila: es exclusiva de los eosinófilos y se caracteriza por ser resistente al cianuro de potasio. (Universidad Nacional de Tucuman, 2015)

Fundamento

Ambas son inactivadas por el alcohol metílico. Para diferenciarlas: se toman 2 preparados, uno de ellos se fija con etanol absoluto y se cubre con CNK 0,04 g/dL, dejar 15 min y lavar con agua destilada y luego ambos preparados se someten a la reacción de peroxidasas:

En el 1er preparado: neutrófilos negativos y eosinófilos positivos.

En el 2º preparado: neutrófilos y eosinófilos positivos.

Las peroxidasas son enzimas de óxido-reducción. Su mecanismo de acción consiste en liberar oxígeno naciente del agua oxigenada: (Figura 35).

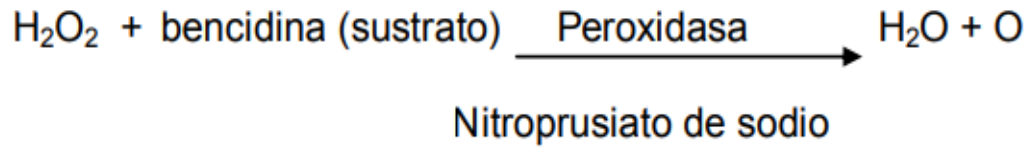


Figura 35. Esquema de la reacción que se lleva a cabo durante la tinción.
Recuperada de: <https://bit.ly/2wzAwQW>

El oxígeno que se libera oxida la bencidina dando un compuesto azul oscuro que luego vira a negro, apareciendo un precipitado (no difusible) en el lugar del citoplasma en donde se ha producido la reacción. Para la demostración de la MPO leucocitaria es imprescindible un catalizador metálico. En este caso se usa el Nitroprusiato de sodio.

Hay peroxidasas leucocitarias y eritrocitarias que se pueden diferenciar por una pequeña variación en la técnica, ya que esta última es resistente a la acción del alcohol metílico. (Figura 36). (Universidad Nacional de Tucuman, 2015)

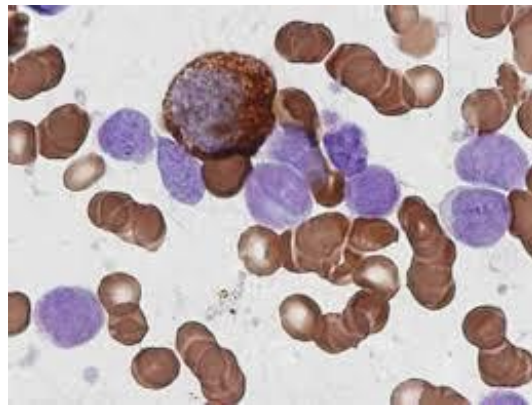


Figura 36. Muestra teñida con la técnica de mieloperoxidasa observada al microscopio.
Recuperada de: <https://bit.ly/3CU9EhR>

Procedimiento

1. Tomar un portaobjetos y revisar que se encuentre en óptimas condiciones de uso.
2. Realizar el frotis correspondiente.

3. Verter sobre la muestra 10 gotas de la solución A y dejar actuar durante 3-5 minutos.
4. Sin decantar o enjuagar la muestra, añadir 10 gotas de la solución B, homogenizar suavemente y dejar actuar durante 3-5 minutos.
5. Observar al microscopio en mínimo aumento el desarrollo de la reacción.
6. Observar la reacción, si esta es débil, repetir la reacción en el mismo frotis.
7. Lavar la muestra con agua y dejar secar.
8. Contracolorar la muestra con Giemsa y dejarlo actuar durante 5-10 minutos.
9. Dejar secar la muestra al aire.
10. Observar al microscopio.

Solución A

- Bencidina base (30 mg).
- Solución saturada de nitroprusiato de sodio (0.1 mL).
- Alcohol etílico absoluto o 96° (9.9 mL).

Solución B

- H₂O₂ al 20-30% (1 gota).
- Agua destilada (10 mL).

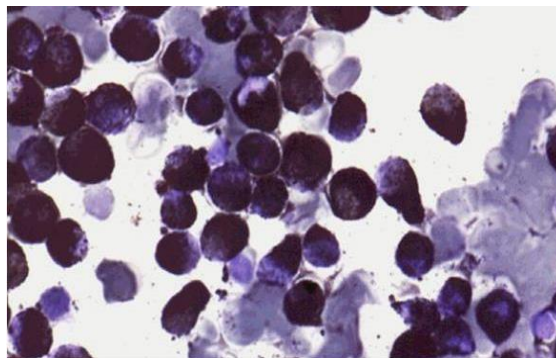


Figura 37. Se observa un patrón granular negro-parduzco citoplasmático en las células positivas. Recuperada de: <https://bit.ly/3Bell78>

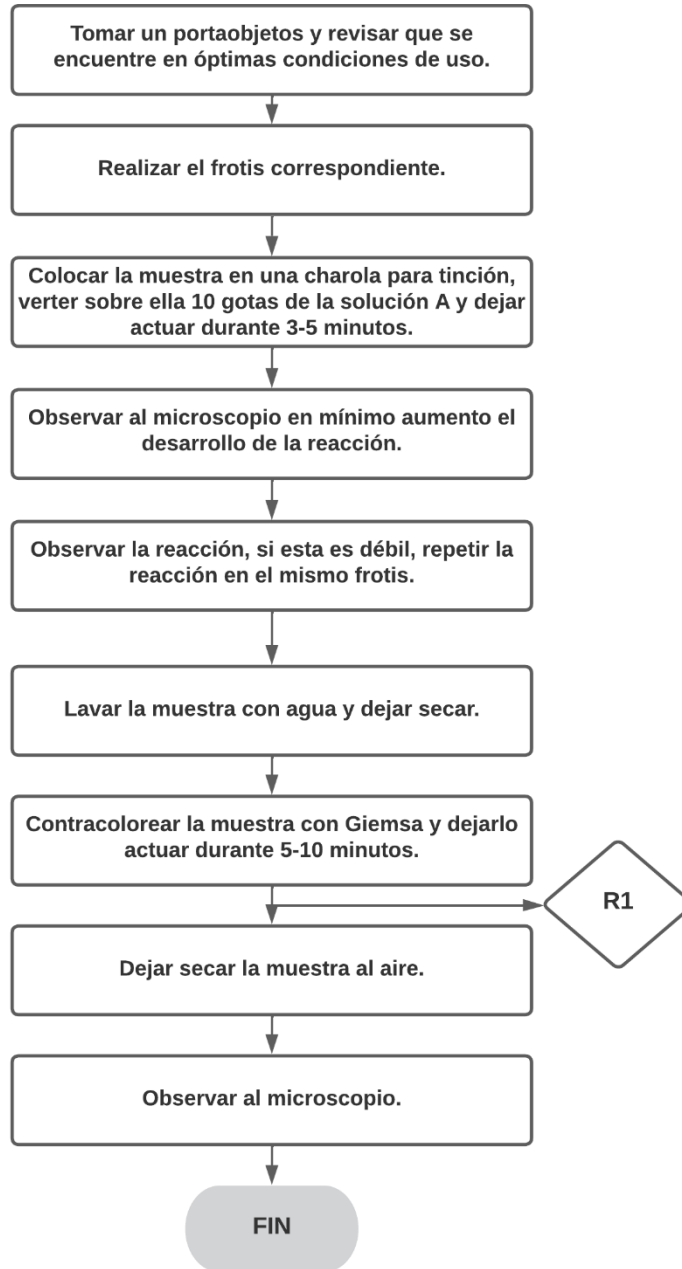
Componentes de la tinción

1. Bencidina.
2. Nitroprusiato de sodio.
3. Alcohol etílico
4. Peróxido de hidrógeno.

Tratamiento de residuos

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.

TINCIÓN DE MIELOPEROXIDASA



Los residuos obtenidos mediante la realización del frotis sanguíneo se deben tratar como RPBI. Todos los residuos se encuentran como una mezcla en la charola para tinción.

R1: Calentar la mezcla hasta reducir el volumen al mínimo y proceder a almacenar en un recipiente apropiado que proteja del daño físico, mantener lejos de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para evitar confusiones y mezclas con otras sustancias.

Tabla 19. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Bencidina, nitroprusiato de sodio, alcohol etílico y peróxido de hidrógeno	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

21 TINCIÓN DE PAPANICOLAOU

Varela (2005) menciona que:

La citología es el estudio de células individuales que tiene el propósito de detectar anomalías morfológicas de las células examinadas que provienen de la descamación de superficies epiteliales, de líquidos corporales o se obtienen por aspiración con aguja.

Una de las aplicaciones más comunes es citología cervical o cérvico-vaginal, que estudia las células exfoliadas de la unión escamo columnar del cuello uterino y ha sido por años el principal método de búsqueda de cáncer cervicouterino, ampliamente reconocido por programas de control y prevención de cáncer como un test que ha reducido la incidencia y mortalidad por cáncer de cuello uterino. Algunos datos indican que programas bien organizados de búsqueda citológica de cáncer, han disminuido la mortalidad por este cáncer hasta en un 70 %.

Además de la detección de lesiones premalignas y malignas, la citología vaginal proporciona información sobre el estado hormonal de la paciente y presencia de microorganismos. La fortaleza del método se basa en décadas de experiencia en su uso, bajo costo, alta especificidad y que las lesiones identificadas pueden ser fácilmente tratables. (p. 131-136)

Fundamento

La tinción de Papanicolaou se aplica a exudados vaginales para la detección de cáncer uterino o vaginal.

La técnica utiliza un elevado número de colorantes en su procedimiento:

- Hematoxilina: es la tinción nuclear escogida, permite básicamente revelar los núcleos de las células presentes en la muestra. Suele usarse Hematoxilina de Harris.
- Orange G: es un colorante sintético de carácter ácido que revela compuestos básicos como la prequeratina (que tiñe de color rosado) o la queratina (que tiñe de color naranja brillante).

- Eosina amarillenta: tiñe de color rosa-anaranjado el citoplasma de las células escamosas maduras, de las células ciliadas y de los eritrocitos.
- Verde Luz SF amarillento: tiñe de color verde-azulado las células escamosas no superficiales (inmaduras o a parcialmente maduras).
- Pardo Bismark R: no tiñe el citoplasma celular pero si la mucina.
- Ácido fosfotúngstico: tiene una función mordiente, especialmente importante para el Verde Luz SF.

Al presentar en su composición varios colorantes, es capaz de revelar diferentes tipos de células. Estas características son las que la hacen óptima para estudios de tipo citológico. La técnica implica el uso de tres soluciones diferentes, por un lado, la correspondiente a la hematoxilina, por otro la que contiene Orange G (solución de Papanicolaou OG) y la última con el resto de colorantes (solución de Papanicolaou EA). (Figura 38). (PanReac AppliChem ITW Reagents, 2019)

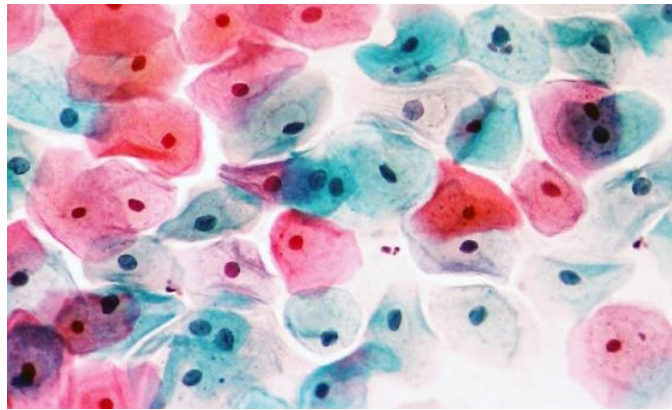


Figura 38. Observación al microscopio de una citología cervical teñida con la técnica de Papanicolaou, recuperada de: <https://bit.ly/3qbfdRk>

Procedimiento

1. Tomar un portaobjetos y revisar que se encuentre en óptimas condiciones de uso.
2. Realizar el exudado vaginal para obtener la muestra.
3. Fijar la muestra con spray.

4. Sumergir la muestra en alcohol a diferentes concentraciones en orden decreciente (80%, 70% y 50%) durante 1 minuto en cada solución.
5. Sumergir la muestra en agua durante 1 minuto.
6. Sumergir la muestra en la solución de Hematoxilina durante 5 minutos.
7. Sumergir la muestra en agua por 6 ocasiones durante 1 segundo.
8. Sumergir la muestra en HCl 0.5% por 8 ocasiones durante 1 segundo.
9. Sumergir la muestra en agua durante 5 minutos.
10. Sumergir la muestra en alcohol a diferentes concentraciones en orden ascendente (50%, 70%, 80% y 96%) durante 30 segundos en cada solución.
11. Sumergir la muestra en la solución de Papanicolaou OG durante 60-90 segundos.
12. Enjuagar el exceso de colorante en dos baños de etanol 96%, sumergiendo la muestra dos veces en cada uno de los baños durante 3-4 segundos.
13. Sumergir la muestra en la solución de Papanicolaou EA durante 1-2 minutos.
14. Enjuagar el exceso de colorante en tres baños de etanol 96%, sumergiendo la muestra dos veces en cada uno de los baños durante 3-4 segundos.
15. Sumergir la muestra en etanol absoluto durante 30 segundos.
16. Sumergir la muestra en un baño 1:1 (xileno y etanol absoluto) durante 4 minutos.
17. Sumergir la muestra en xileno durante 3 minutos.
18. Dejar secar.
19. Observar al microscopio.

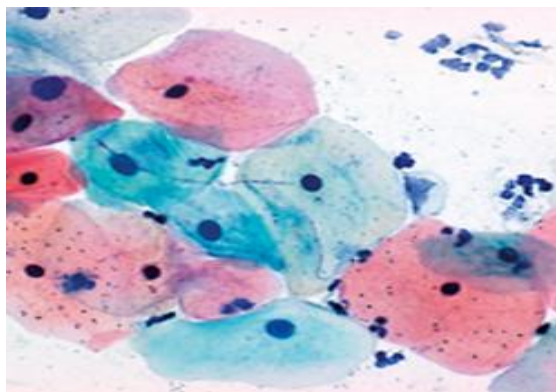


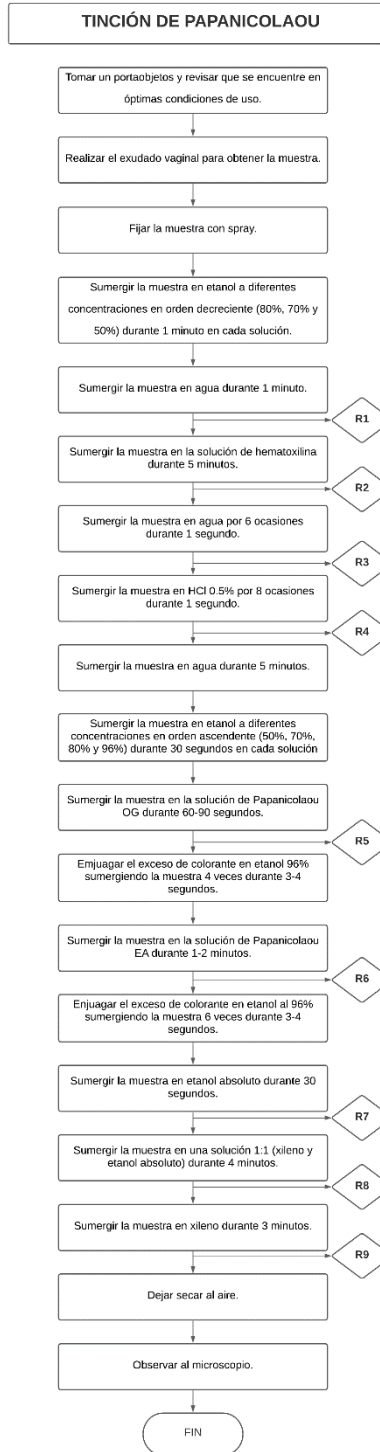
Figura 39. En la imagen se pueden observar los diferentes colores que proporciona la tinción, gracias a sus propiedades policrómicas. Tinción de Papanicolaou, recuperada de: <https://bit.ly/3RCUhON>

Componentes de la tinción

1. Solución de Papanicolaou OG 6
2. Solución de Papanicolaou EA 50
3. Hematoxilina
4. Etanol (100, 96, 80, 70 y 50%).
5. Xileno
6. HCl

Tratamiento de residuos

Recolectar los residuos en un frasco ámbar y etiquetarlo de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.



- R1. Calentar la mezcla hasta disminuir el volumen al mínimo o de ser posible hasta su total evaporación.
 R2. Almacenar en un recipiente que lo proteja de la luz, daños físicos, del calor y de posibles mezclas con otras sustancias. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para su disposición final.
 R3. Calentar la mezcla hasta disminuir el volumen al mínimo, resguardar el restante en un recipiente apropiado y etiquetarlo de manera adecuada para su disposición final.
 R4. Almacenar en un recipiente que proteja de la luz solar, del calor y de posibles mezclas con otras sustancias. Etiquetar el recipiente adecuadamente para su disposición final.
 R5. Almacenar en un recipiente que proteja de la luz, del calor y de posibles mezclas con otras sustancias. Etiquetar el recipiente adecuadamente para su disposición final.
 R6. Almacenar en un recipiente que proteja de la luz, calor y de posibles mezclas con otras sustancias. Etiquetar el recipiente adecuadamente para su disposición final.
 R7. Mezclar el etanol a diferentes concentraciones en un solo recipiente, proceder a calentar la mezcla hasta su total eliminación.
 R8. Almacenar en un recipiente que proteja de la luz, calor y posibles mezclas con otras sustancias. Etiquetar el recipiente adecuadamente para su disposición final.
 R9. Almacenar en un recipiente que proteja de la luz, calor y posibles mezclas con otras sustancias. Etiquetar el recipiente adecuadamente para su disposición final.

Tabla 20. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Alcohol al 80, 70 y 50 %	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Calentar la mezcla hasta su completa eliminación o en su defecto, almacenar el sobrante en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R2	Hematoxilina	Toxicidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R3	Agua y hematoxilina	Toxicidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R4	HCl	Corrosividad Reactividad Toxicidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R5	Solución de Papanicolaou OG y etanol al 96 %	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R6	Solución de Papanicolaou EA y etanol al 96 %	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R7	Etanol absoluto	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Mezclar el etanol de diferentes concentraciones en un recipiente ámbar y proceder a calentar la mezcla hasta su total eliminación o en su defecto, almacenar el sobrante en un

			frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R8	Xileno y etanol absoluto	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R9	Xileno	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

22 TINCIÓN DE PERLS

Andrews (2008) describe a:

La tinción de Perls como una de las técnicas citoquímicas más antiguas, prácticamente sin cambios desde su descripción original. Es uno de los mejores métodos para conocer las reservas de hierro (Fe) en la médula ósea (MO), que se encuentran en forma de hemosiderina, lo cual es importante para el diagnóstico de una variedad de patologías hematológicas.

Fundamento

Andrews (2008) menciona que:

La hemosiderina y la ferritina son las principales formas de almacenar hierro del organismo. El hierro que se libera de la degradación de la hemoglobina, si no se usa inmediatamente para una nueva síntesis, se almacena en los macrófagos de la MO en forma de hemosiderina o ferritina.

La hemosiderina es un agregado de hierro, componentes lisosomales y otros productos de digestión intracelular.

El Fe que se encuentra depositado en el interior de las células en forma de agregados o gránulos insolubles en agua es detectable citoquímicamente mediante la reacción de Perls. Dichos gránulos se observan en el interior de los eritroblastos (sideroblastos) en algunos eritrocitos (siderocitos) y en los macrófagos medulares, del hígado y del bazo.

El hierro depositado se libera por acción del ácido clorhídrico y reacciona con ferrocianuro potásico para formar ferrocianuro férrico. Esta técnica pone en evidencia la presencia de complejos insolubles de Fe por la formación de un precipitado coloreado (azul de Prusia). La intensidad del color es un parámetro solamente cualitativo y su utilidad es evaluar las reservas de Fe al permitir una semicuantificación de los depósitos. (p. 219-230)

Como muestra se pueden utilizar extendidos de médula ósea, con material suficiente para evitar resultados erróneos, o bien, frotis de sangre periférica, orina y cortes histológicos. (Figura 40).

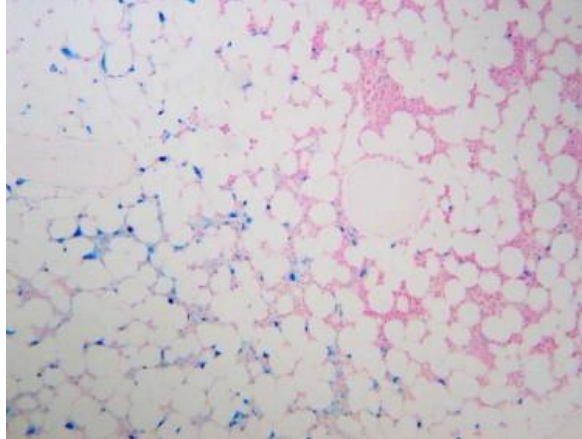


Figura 40. Muestra de médula ósea tratada con la tinción de Perls donde se observan los complejos insolubles de hierro en color azul. Recuperada de: <https://bit.ly/3RIFFn8>

Procedimiento

1. Realizar el frotis usando la técnica adecuada dependiendo de la muestra a tratar.
2. Fijar el extendido con metanol, etanol absoluto o vapores de formol durante 10-15 minutos.
3. Lavar la muestra con agua mediante inmersión por 2-3 ocasiones.
4. Sumergir la muestra en un baño con una mezcla de partes iguales de ferrocianuro de potasio al 2% y HCl al 2% exento de Fe, durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Lavar con agua destilada.
6. Añadir a la muestra safranina durante 30-45 segundos.
7. Lavar con agua destilada.
8. Observar al microscopio.

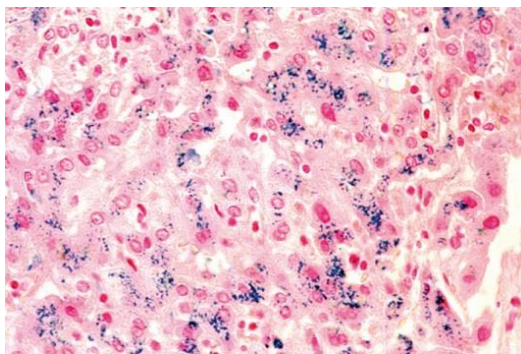


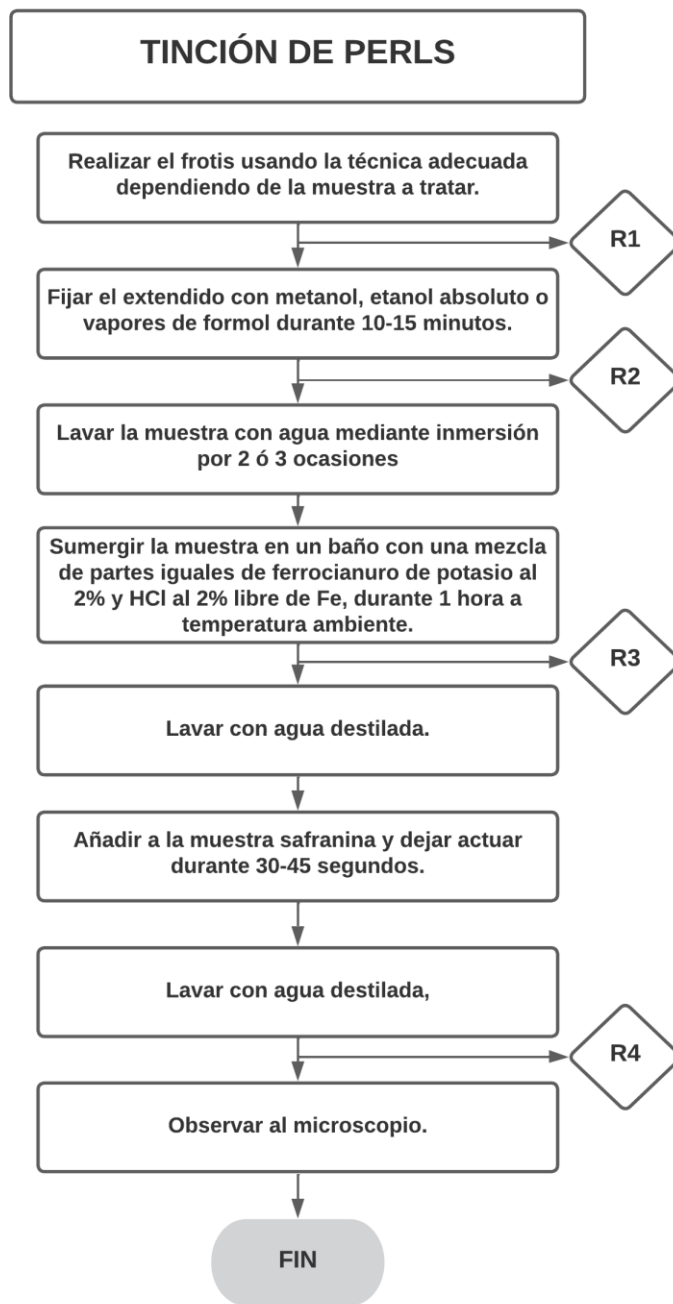
Figura 41. Muestra de médula ósea tratada con la tinción de Perls, en la imagen se pueden observar los depósitos de hierro. En condiciones normales se observan sideroblastos en cuyo interior aparecen de 1 a 4 gránulos en el citoplasma. El aumento en el número de gránulos indica un depósito excesivo de Fe y la existencia de una alteración en su metabolismo, que conduce a un depósito de Fe en el interior de las mitocondrias. Recuperada de: <https://bit.ly/3KMWKnE>

Componentes de la tinción

1. Metanol o etanol absoluto o vapores de formol.
2. Ferrocianuro de potasio al 2%.
3. HCl al 2% libre de Fe.

Tratamiento de residuos

Recolectar en un frasco ámbar (por separado) los residuos 2, 3, 4 y etiquetarlos de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.



R1: Manejar como lo indican los RPBI.
 R2: Almacenar en un solo recipiente con el fin de proceder a calentar la mezcla hasta reducir el volumen al mínimo o en su defecto lograr la eliminación total de la mezcla por medio de evaporación.
 R3: Almacenar en un recipiente que proteja de la luz solar directa, del daño físico, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para proceder a su disposición final.
 R4: Almacenar en un recipiente que proteja de la luz solar directa, del daño físico, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para proceder a su disposición final.

Tabla 21. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Frotis sanguíneo o fluido corporal	Biológico-infeccioso	Manejar como lo indican los RPBI
R2	Metanol, etanol absoluto o vapores de formol	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar y proceder al calentamiento de la mezcla hasta su total eliminación o en su defecto, almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R3	Ferrocianuro de potasio y HCl	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R4	Safranina	Toxicidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

23 TINCIÓN DE SCHIFF

La reacción PAS (Peryodic-Acid-Schiff) es uno de los métodos químicos de más frecuente aplicación en la histología. La presente tinción PAS - para detección de aldehídos y mucosustancias es utilizada para el diagnóstico celular en la medicina humana y se emplea en el examen histológico de muestras de origen humano. (PanReac AppliChem ITW Reagents, 2019)

Fundamento

En la reacción PAS, el material histológico primero es tratado con ácido peryódico, oxidándose durante este proceso los 1,2-glicoles a grupos aldehído. A través de la adición del reactivo de Schiff (leucofucsina) en el segundo paso, los aldehídos reaccionan en una intensa reacción cromática de color rojo. La reacción PAS tiene como resultado una reacción cromática específica con polisacáridos no sustituidos, mucopolisacáridos neutros, muco y glicoproteínas, así como glico y fosfolípidos.

Mediante la combinación de la reacción PAS con la tinción de azul alcian se pueden representar adicionalmente mucosustancias ácidas (glicosaminoglicanos). (Figura 42). (PanReac AppliChem ITW Reagents, 2019)

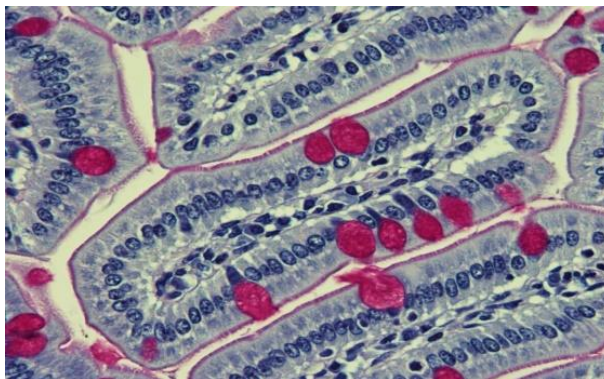


Figura 42. Muestra histológica teñida con la técnica de Schiff, observada al microscopio. Recuperada de: <https://bit.ly/3cOYWpb>

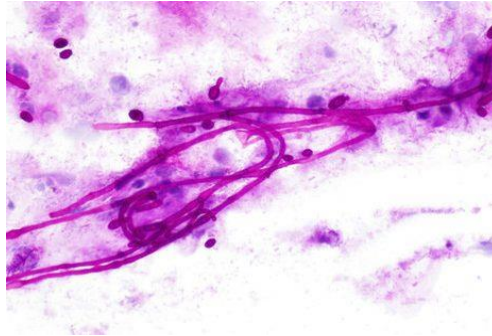


Figura 43. *Cepillado esofágico en el cual se observan esporas e hifas con respuesta inflamatoria, la muestra fue tratada con la tinción de PAS. Recuperada de: <https://bit.ly/3BiJAvA>*

Procedimiento

1. Tomar el portaobjetos con el preparado histológico.
2. Enjuagar la muestra con agua destilada.
3. Sumergir la muestra en la solución de ácido periódico durante 5 minutos.
4. Lavar la muestra con agua durante 3 minutos.
5. Enjuagar la muestra con agua destilada.
6. Sumergir la muestra en el reactivo de Schiff durante 15 minutos.
7. Lavar la muestra con agua durante 3 minutos.
8. Enjuagar la muestra con agua destilada.
9. Sumergir la muestra en hematoxilina de Harris durante 2 minutos.
10. Lavar la muestra con agua durante 3 minutos.
11. Sumergir la muestra en baños de alcohol a concentraciones ascendentes (70%, 96% y 100%) por duplicado durante 1 minuto respectivamente.
12. Sumergir la muestra en xileno durante 10 minutos.

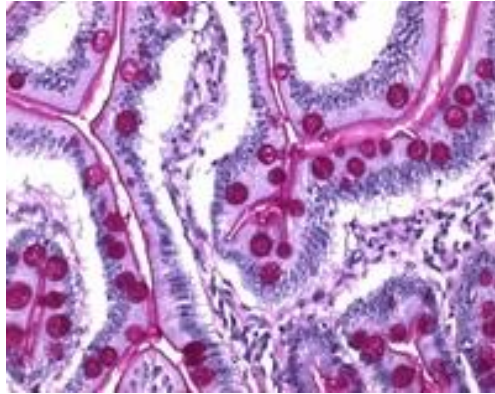


Figura 44. Los núcleos se pueden visualizar en azul, polisacáridos, glicógeno, mucopolisacáridos neutros, muco y glicoproteínas, glico y fosfolípidos, membrana basal, colágeno en rojo/púrpura. Recuperada de: <https://bit.ly/3wZHUEL>

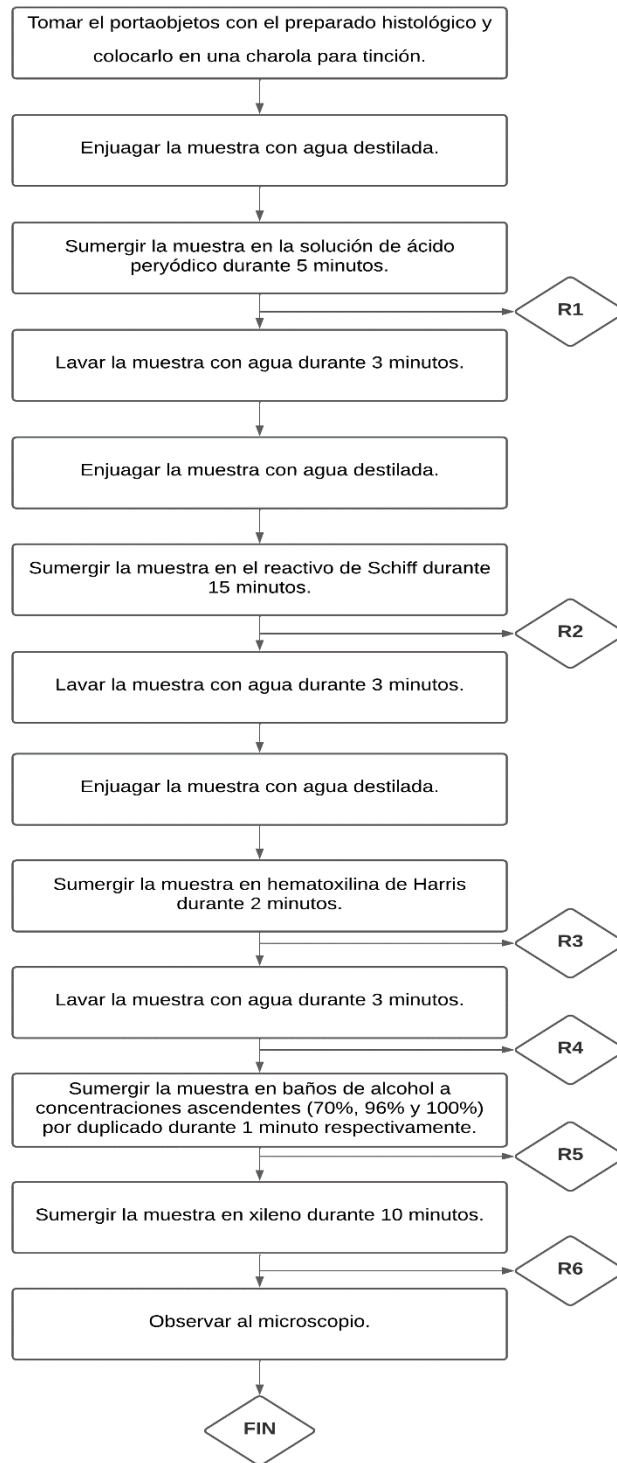
Componentes de la tinción

1. Ácido periódico.
2. Reactivo de Schiff.
3. Hematoxilina.
4. Alcohol.
5. Xileno.

Tratamiento de residuos

Recolectar en un frasco ámbar (por separado) los residuos 1, 2, 3, 5, 6 y etiquetarlos de manera adecuada usando la etiqueta vigente en la FES-C.

TINCIÓN DE PAS



R1, R2, R3 y R6: Almacenar en un recipiente adecuado que proteja del daño físico, de la luz solar directa, lejos del calor y materiales incompatibles. Etiquetar el recipiente de manera adecuada para su disposición final.
 R4: Se puede desechar por el alcantarillado sin ningún inconveniente.
 R5: Almacenar en un recipiente adecuado para proceder a calentar la mezcla hasta obtener un volumen mínimo o en su defecto la eliminación total de la mezcla por medio de la evaporación.

Tabla 22. Información general acerca del manejo integral y clasificación de residuos.

CLAVE DEL RESIDUO	COMPONENTES DEL RESIDUO	CLASIFICACIÓN CRETIB	DISPOSICIÓN O TRATAMIENTO DEL RESIDUO
R1	Ácido peryódico	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R2	Reactivo de Schiff	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R3	Hematoxilina	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R4	Agua	-	Se puede eliminar por el alcantarillado sin ningún inconveniente
R5	Alcohol al 70, 96 y 100 %	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Mezclar los alcoholes en un solo recipiente y proceder a calentar hasta su total eliminación o en su defecto, almacenar el sobrante en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta
R6	Xileno	Corrosividad Toxicidad Inflamabilidad	Almacenar en un frasco ámbar etiquetado de manera correcta

24 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Por medio de la investigación bibliográfica realizada en este trabajo se logró recopilar la información más importante y detallada de las tinciones más utilizadas dentro de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, lo cual es de suma importancia ya que se explica de manera clara y concisa el fundamento, procedimiento, imágenes de resultados y la recolección y almacenamiento de los residuos de todas y cada una de las tinciones mencionadas en este trabajo.

El manual de tinciones es una herramienta que será de gran ayuda para todas las personas que lo revisen, pues servirá de guía tanto para el alumnado de la Facultad, como los profesores, laboratoristas y personal encargado de la recolección de los residuos generados por las tinciones que se utilizan en los laboratorios de enseñanza que se imparten en la Facultad, dando pauta a que éste trabajo sea complementado en un futuro, puesto que hay tinciones que no son mencionadas y dan pie a que el manual sea editado y complementado en el futuro.

El manejo integral de residuos es un tema que debe de ser tratado en todos los ámbitos a nivel social, pues el incremento en la producción de insumos que se ocupan en la sociedad, el trabajo realizado en los laboratorios de enseñanza y en las diferentes industrias a nivel mundial, generan residuos de diferentes tipos, fomentando así que se cree una consciencia acerca de ello.

La normatividad vigente en este ámbito nos brinda las pautas generales para darle un correcto manejo integral a los residuos, apoyando así en la generación de consciencia en este ámbito que en las últimas décadas ha tenido un alto crecimiento y desarrollo.

25 PROYECCIONES

Al haber tantas carreras dentro de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, el trabajo puede ser complementado en un futuro por cualquiera de los alumnos que estudien dentro de la Facultad, ya que hay varias tinciones que no fueron mencionadas en este trabajo. Por lo tanto, queda una puerta abierta para que el trabajo sea complementado en el futuro, con el fin de que se genere la menor cantidad de residuos peligrosos y su almacenamiento y resguardo se lleve a cabo de la manera correcta.

Dando pie a que haya un incremento en el interés por parte de toda la comunidad de la Facultad en el manejo integral de residuos.

26 CONCLUSIONES

La realización de este trabajo cumple con los objetivos tanto generales como particulares, puesto que la recopilación de la información, organización y resumen de dicha información contiene los puntos más importantes de todas y cada una de las tinciones mencionadas. Ayudando así a tener un panorama general a todos los alumnos, profesores, laboratoristas y personal encargado de la recolección de residuos dentro de la Facultad y así, proceder al manejo integral de los mismos.

El manual de tinciones es de suma importancia para la Facultad, puesto que permitirá a los alumnos aprender el fundamento, procedimiento y el manejo integral de residuos generados por cada una de las tinciones mencionadas en el trabajo

El interés en aumento por el manejo integral de residuos es un tema que debe de tratarse no solo en las entidades en las que haya laboratorios de enseñanza, sino también dentro de la industria, por lo cual es de suma importancia enfocarse en la generación mínima de residuos peligrosos que llegan a contaminar el medio ambiente. El trabajo de los laboratoristas y personal encargado de la recolección de residuos dentro de la Facultad, será más sencillo puesto que el manual les permitirá elaborar su trabajo de una manera más simple.

Aunado a esto, la revisión de las normas oficiales mexicanas que fueron analizadas en este trabajo, permite dar un panorama general respecto a la protección ambiental, operación, monitoreo, separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición de los diferentes residuos generados dentro de la Facultad, apoyando en la concientización acerca del manejo integral de los residuos generados al momento de realizar las tinciones mencionadas en este trabajo.

27 REFERENCIAS

- Andrews N. (2008). Forging a Field: The Golden age of iron biology. *Blood*. 2008 Jul 15; 112(2):219-30.
- Arribas, J. (2005). *Hematología Clínica Temas de Patología*. (4 ed). Universidad de Oviedo.
- Ben-Selma W, et al. (2009). Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum by Patho-TB kit in comparison with direct microscopy and culture. *Diagn Microbiol Infect*
- Beveridge T, (1991). Surface layers of bacteria. *Microbiol Rev*. 1991; 55: 684-705.
- Bioquimichem. (2019). Kit de tinción PAS. Disponible en: <https://cutt.ly/nw7NVFT>
- Calvo G, (2011). *Técnicas en Histología y Biología Celular*. (2 ed). España, Madrid: Elsevier.
- Chemical Book. (2017). Crystal Violet. Recuperado de: <https://cutt.ly/Bw1SdTo>
- Collard P, (1985). *El Desarrollo de la Microbiología*. (2 ed). México, Ciudad De México: Reverté.
- Decré D, et al., (2000). Apport du laboratoire de microbiologie au diagnostic des diarrhées nosocomiales. *Pathol Biol. France, Paris*. Dis. 65: 733-744.
- Facultad de Medicina Argentina. (2015). *Microbiología General*. Disponible en: <https://cutt.ly/2euVKtS>
- Facultad de Medicina de Argentina. (2017). Tinción de esporas Wirtz-Conklin. Disponible en: <https://cutt.ly/ZeuCuZd>
- Farrant J. (1954). An electron microscopic study of ferritin. *Biochim Biophys Acta*. 13: 569-576.
- Forbes B, et al., (2009). *Diagnóstico Microbiológico*. (12 ed). México: Médica Panamericana.
- Fung DC, Theriot JA. Imaging techniques in microbiology. *Curr Opin Microbiol*. 1998; 1: 346-351.
- Guarner J, (2011). Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Revista de Microbiología Clínica*; 24: 247-280.

Keller PJ, (2013). Imaging morphogenesis: technological advances and biological insights. *Science*; 340: 123-168.

Koneman E. (2006). *Diagnóstico Microbiológico*. (6 ed). México: Médica Panamericana.

Larone D. (2011). *Medical important fungi. A guide to identification*. (5 ed). USA: American Society for Microbiology.

Lifeder. (2017). Tinción de May Grünwald-Giemsa. México. Disponible en: <https://cutt.ly/refTKtl>

Lifeder. (2017). Tinción Hematoxilina-Eosina. México. Disponible en: <https://cutt.ly/Ow1St7m>

Llovo, J. (2016). *Diagnóstico Clínico de las Micosis*. (14 ed). Pfizer: México. Disponible en: <https://cutt.ly/LeZKUcx>

Mc K. (1954). Staining bacterial polysaccharides. *J Bacteriol*. 66: 453-454.

Merck KG. (2015). Kit de tinción rojo congo. Disponible en: <https://cutt.ly/veuBM7B>

Milstein C. (2016). Laboratorio de Hematología. *Hematología Vol. 20*; Mayo-Agosto; 243-246.

Murray P, (2007). *Manual of clinical microbiology*. (9 ed). USA: American Society for Microbiology.

Murray P, (2007). *Manual of clinical microbiology*. (9 ed). USA: American Society for Microbiology.

Murray P, (2007). *Manual of clinical microbiology*. (9 ed). USA: American Society for Microbiology.

Nagata K, (2010). Usefulness and limit of Gram staining smear examination. *Rinsho Byori*. 58: 490-497.

Ohi M, et al. (2004). Negative staining and image classification powerful tools in modern electron microscopy. *Biol Proced Online*. 6: 23-34.

Ohi M, et al. (2004). Negative staining and image classification powerful tools in modern electron microscopy. *Biol Proced Online*. 6: 23-34.

PanReac AppliChem ITW Reagents. (2017). Tinción hematoxilina-eosina. España. Disponible en: <https://cutt.ly/nw1SeVc>

PanReac AppliChem ITW Reagents. (2019). Tinción Papanicolaou. España. Disponible en: <https://cutt.ly/Xw360pE>

PanReac AppliChem ITW Reagents. (2019). Tinción PAS. España. Disponible en: <https://cutt.ly/Bw7NNw3>

Popescu A, (1996). The Gram stain after more than a century. Biotech Histochem. 71: 145-151.

Prescott L. (2000). Microbiology. (5 ed). USA: McGraw-Hill.

Química Clínica Aplicada. (2016). BK Kinyoun Kit. Disponible en: <https://cutt.ly/JeuVf25>

Sánchez, M. (2013). Reactivo de Lugol: Historia de su descubrimiento y aplicaciones didácticas. México: UNAM. 31-36.

Selvakumar N, et al. (2002). Inefficiency of 0.3% carbol fuchsin in ziehl-neelsen staining for detecting acid-fast bacilli. J Clin Microbiol; 40: 3041-3043.

Universidad Nacional de Tucuman. (2015). Citoquímica Hematológica. Disponible en: <https://cutt.ly/xeuC3UW>

Varela S. (2005). Citología Cervical. Revista Médica de Honduras. 73: 131-136.

28 HOJAS DE SEGURIDAD

Las hojas de seguridad son de suma importancia, ya que nos brindan información necesaria acerca de los cuidados y el manejo que se debe de realizar cuando se trabaja con cualquiera de los reactivos que se utilizan en cada una de las tinciones mencionadas en el trabajo, así como las acciones que se deben de seguir en caso de que ocurra algún accidente durante el manejo de los reactivos.

Ácido acético glacial	https://bit.ly/3TEC2JX
Ácido láctico	https://bit.ly/3CRjShf
Ácido peryódico	https://bit.ly/3sfn81a
Ácido tánico	https://bit.ly/3DcXCQn
Agua destilada	https://bit.ly/2m5Mv6Q
Alcohol	https://bit.ly/3gsgUbx
Alcohol ácido	https://bit.ly/3MOZF08
Alcohol etílico	https://bit.ly/3VM4xaf
Alcohol/acetona	https://bit.ly/3eP8Scg
Azul de cresil brillante	https://bit.ly/3MRhwmY
Azul de lactofenol	https://bit.ly/3groQcR
Azul de metileno	https://bit.ly/3sekLvt
Bencidina	https://bit.ly/3CSq8VT
Carbofucsina	https://bit.ly/3COeqM9
Cloruro de sodio	https://bit.ly/3FgL5gn
Colorante de Giemsa	https://bit.ly/3Df0Pi9
Colorante May-Grünwald	https://bit.ly/3EWZvIx
Cristal violeta	https://bit.ly/3F0rNvA
Dimetilsulfóxido	https://bit.ly/3Ddvlci
Eosina	https://bit.ly/3TEHyw9
Etanol	https://bit.ly/3DfMOKi
Fenol	https://bit.ly/3eMjKrk
Ferrocianuro de potasio	https://bit.ly/3z0qAiM
Floxina B	https://bit.ly/3yZfz2b

Fucsina básica	https://bit.ly/3TiY0T9
Fucisna fenicada	https://bit.ly/3MNUc4l
Glicerol	https://bit.ly/3F00zF3
HCl	https://bit.ly/3z0ZwB3
Hematoxilina	https://bit.ly/3sdEaN3
KOH	https://bit.ly/3CUoYcq
Lugol	https://bit.ly/3Dq89Kz
Etanol	https://bit.ly/3Dppr8l
Nigrosina	https://bit.ly/3zmiEd9
Nitroprusiato de sodio	https://bit.ly/3SkPh1n
Peróxido de hidrógeno	https://bit.ly/3F02gmb
Reactivo de Schiff	https://bit.ly/3SiyzPZ
Rojo Congo	https://bit.ly/3z1o3pM
Safranina	https://bit.ly/3Ts1KBS
Solución buffer 7.2	https://bit.ly/3DfeiXm
Solución de Papanicolaou EA 50	https://bit.ly/3F3J6f1
Solución de Papanicolaou OG 6	https://bit.ly/3Tn1MLd
Solución salina isotónica	https://bit.ly/3zmkuL5
Tinta china	https://bit.ly/3MNx7UE
Vapores de formol	https://bit.ly/3VK8jRF
Verde brillante	https://bit.ly/3scjTY3
Verde de malaquita	https://bit.ly/3MOe4JU
Xileno	https://bit.ly/3ePwMQ0
Xilol	https://bit.ly/3seuUbn
Yodo molecular	https://bit.ly/3sbpNsy
Yoduro potásico	https://bit.ly/3yUJxEA