



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Elaboración y validación del libro
“Las tinciones básicas en el laboratorio de
microbiología: un enfoque gráfico”

TESIS

Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTAN

Briseida Elizalde Cuevas
Marian Estefanía Cortes Cruz

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. Roberto Cruz González Meléndez



Ciudad de México, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



ÍNDICE

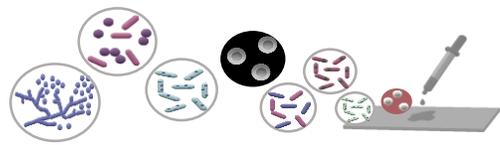
AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA	6
1. INTRODUCCIÓN	8
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1 Importancia de los microorganismos	10
2.2 Historia de la Microbiología y la importancia de las tinciones	12
2.3 Historia del microscopio	15
2.4 Fundamentos de microscopía óptica	17
2.5 El microscopio	17
2.5.1 Microscopio óptico.....	18
2.5.2 Características de un microscopio	21
2.5.2.1 Resolución.....	21
2.5.2.2 Contraste.....	22
2.5.2.3 Aumento	22
2.5.2.4 Oculares	23
2.5.2.5 Objetivos	23
2.5.3 Cuidado del microscopio	24
2.6 Bacterias	25
2.6.1 Morfología y agrupación microscópica bacteriana	28
2.6.1.1 Tamaño	29
2.6.1.2 Forma	29
2.6.1.3 Agrupación	30
2.6.1.4 Otras.....	33
2.7 Hongos	33
2.7.1 Clasificación	35
2.8 Examen microscópico	36
2.8.1 Examen de los microorganismos vivos	36



2.8.2 Preparaciones fijadas y coloreadas.....	37
2.9 Colorantes.....	38
2.9.1 Clasificación	39
2.10 Mordentes	40
2.11 La tinción	41
2.11.1 La naturaleza de los procesos de tinción	41
2.11.1.1 Tinción mediante procesos físicos.....	41
2.11.1.2 Tinción mediante procesos químicos	42
2.11.1.3 Base química de la tinción.....	43
2.11.2 Factores que afectan a la tinción.....	44
2.11.3 Principales ventajas de las tinciones	46
2.11.4 Realización de la tinción.....	46
2.11.4.1 Preparación de muestras	46
2.11.4.1.1 Extensión de la muestra	46
2.11.4.1.2 Secado	47
2.11.4.1.3 Fijación	47
2.11.4.2 Coloración	48
2.11.4.3 Decoloración	48
2.11.4.4 Lavado.....	48
2.11.4.5 Coloración de contraste.....	49
2.11.4.6 Observación al microscopio	49
2.12 Bioseguridad y manejo de Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos 49	
2.12.1 Normas generales de bioseguridad en el laboratorio ⁽⁴⁷⁾	50
2.12.2 Manejo de Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (RPBI).....	50
2.12.3 Aspectos prácticos	52
2.13 Clasificación y técnicas de tinción	54
Clasificación de las tinciones de acuerdo a la vitalidad de las células	54
Tinción no vital	54
Tinción vital o inmediata	54
Tinción intravital	54
Tinción supravital	54
Clasificación de las tinciones de acuerdo a las estructuras que tiñe.....	55
2.13.1 Tinciones simples.....	55
2.13.1.1 Tinción de azul de algodón lactofenol	55
2.13.1.1.1 Fundamento de la tinción de azul de algodón lactofenol.....	56

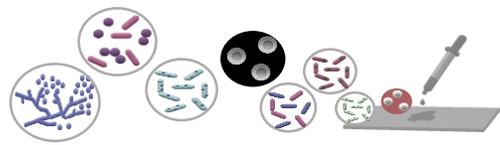


2.13.2 Tinciones diferenciales	58
2.13.2.1 Tinción de Gram	59
2.13.2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	59
2.13.2.1.2 <i>Streptococcus pyogenes</i>	60
2.13.2.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
2.13.2.1.4 <i>Escherichia coli</i>	62
2.13.2.1.5 Fundamento de la tinción de Gram	63
2.13.2.1.6 La reacción de Gram	63
2.13.2.1.7 Mecanismo de la tinción	65
2.13.2.1.8 Variaciones de la reacción	67
2.13.2.2 Tinción de Ziehl Neelsen	68
2.13.2.2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	70
2.13.2.2.2 <i>Mycobacterium phlei</i>	70
2.13.2.2.3 Fundamento de la tinción de Ziehl Neelsen	70
2.13.2.3 Tinción de Kinyoun	73
2.13.2.3 <i>Rhodococcus equi</i>	73
2.13.2.3.1 Fundamento de la tinción de Kinyoun	74
2.13.3 Tinciones especiales	76
2.13.3.1 Tinción de cápsula	76
2.13.3.1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	77
2.13.3.1.2 <i>Cryptococcus neoformans</i>	78
2.13.3.2 Tinción de tinta china	79
2.13.3.2.1 Fundamento de la tinción de tinta china	79
2.13.3.3 Tinción de rojo Congo	80
2.13.3.3.1 Fundamento de la tinción de rojo Congo	80
2.13.3.4 Tinción de gránulos metacromáticos	82
2.13.3.4.1 <i>Corynebacterium xerosis</i>	82
2.13.3.5 Tinción de Albert	82
2.13.3.5.1 Fundamento de la tinción	82
2.13.3.6 Tinción de azul de metileno o de Loeffler	84
2.13.3.6.1 Fundamento de la tinción de azul de metileno o de Loeffler	84
2.13.3.7 Tinción de esporas	85
2.13.3.7.1 <i>Bacillus cereus</i>	85
2.13.3.8 Tinción de Schaeffer Fulton	86
2.13.3.8.1 Fundamento de la tinción	86
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	89
4. HIPÓTESIS	90



5. OBJETIVOS	91
6. MATERIAL Y MÉTODOS	92
7. RESULTADOS	94
4 DISCUSIÓN	309
5 CONCLUSIONES	322
6 PERSPECTIVAS	324
7 REFERENCIAS	325
8 ANEXOS	333





Agradecimientos

A nuestra máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por las oportunidades que nos brindó para crecer profesionalmente.

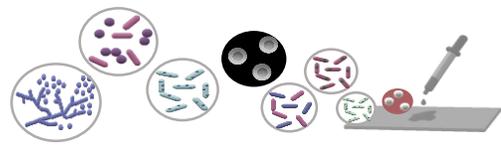
A la Clínica Universitaria para la Atención a la Salud "Zaragoza", por proporcionarnos las instalaciones y recursos necesarios para realizar este trabajo.

A nuestro director de tesis, el M. en C. Roberto Cruz González Meléndez, por permitirnos realizar el presente trabajo, brindándonos en todo momento su tiempo, disposición, motivación, apoyo y confianza. Le agradecemos por guiarnos y aportarnos aspectos nuevos que nos impulsaran a mejorar nuestro trabajo.

A nuestro asesor de tesis, el Q.F.B. Manuel Orduña Sánchez, por el apoyo que nos brindó, por escuchar atentamente nuestras dudas e inquietudes, además de prestar de su valioso tiempo para ayudarnos a resolverlas.

A nuestros sinodales, la Mtra. Dora Alicia Pérez González, la Q.F.B. Patricia Vidal Millan y la Q.F.B. Lilia Tequianes Bravo, por dedicar su valioso tiempo en revisar el presente trabajo e indicarnos las observaciones pertinentes para su mejora.

A todos los profesores y personal que hicieron posible la realización de esta tesis.



Dedicatoria

A Dios, por la vida y todas las oportunidades que me ha otorgado en ella, por todas las hermosas personas que ha puesto en mi camino, por brindarme una familia tan unida y maravillosa, de la cual estoy muy orgullosa y agradecida por tener en mi vida, quienes siempre me han brindado su amor, consejos, comprensión y apoyo incondicional.

A mis papás, Memo y Rose, por todo el esfuerzo que han invertido a lo largo de estos años y por brindarme los valores necesarios para ser una persona de bien. Por enseñarme con su ejemplo que, para ser feliz debo hacer siempre lo que más me gusta. No existen las palabras para agradecerles tanto.

A mis hermanos, Óscar y Gemita, por inspirarme a ser mejor cada día, fomentando en mí el deseo de superación y triunfo.

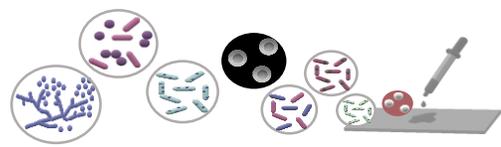
A mi novio, Manuel, por su apoyo y amor incondicional, por creer como yo, que el amor verdadero existe.

Ustedes son parte esencial de este logro, los amo.

A mi amiga, Marian, por su valiosa amistad, con quien he compartido desde hace ya varios años alegrías, preocupaciones y conocimientos. Qué hermosa sorpresa haber coincidido contigo en la realización de este trabajo. Éxito en todo, en mí siempre tendrás una buena amiga. Te quiero mucho.

A mis amigos de la carrera y a los profesores que hicieron de mi paso por la máxima casa de estudios una bonita experiencia, porque de alguna forma han sido partícipes de la consecución de este logro.

Con mucho cariño, Bris.



Dedico el presente trabajo:

A Dios, por permitirme despertar cada día con la posibilidad de vivir cosas maravillosas, por cada experiencia de la que me permite aprender algo nuevo y por todas las personas valiosas que ha puesto en mi vida.

A mis padres, a quienes admiro infinitamente. Gracias por los valores y principios que me han enseñado y también por el cariño, comprensión y apoyo que siempre me dan. Ustedes me impulsan para poder superarme y cumplir mis metas.

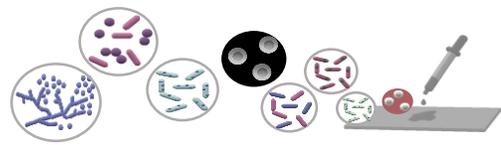
A mi familia, por estar presente en cada etapa de mi vida, por brindarme los más valiosos consejos y lecciones de vida. Gracias por continuar apoyándome en mi crecimiento personal y profesional.

A todos mis amigos y seres queridos, que han llegado a mi vida para permanecer en ella y con quienes he pasado momentos inolvidables. Gracias por siempre estar a mi lado brindándome todo su afecto y aliento a lo largo de la carrera y durante la realización de este trabajo.

A mi compañera de tesis y muy querida amiga, Bris. Gracias por tu disposición, esfuerzo y apoyo para poder realizar este trabajo juntas, pero aún más importante, gracias por tu amistad. Sé que lograrás todo lo que te propongas en la vida y por favor recuerda que, en mí, cuentas con una amiga que te estima y quiere mucho.

Finalmente quiero agradecer a mi eterna y amada amiga de cuatro patas, que siempre me acompañó y cuidó fielmente en todo momento. Siempre estarás en mis más preciados y hermosos recuerdos.

Marian.



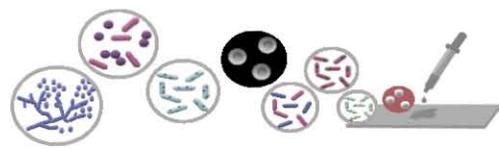
1. Introducción

Las tinciones en Microbiología Médica son la principal herramienta empleada en el laboratorio para el diagnóstico y tratamiento oportuno de patologías. Una, la más empleada, la tinción de Gram, que se considera fundamental para la valoración inicial de muestras biológicas para los análisis bacteriológicos. Entre otra de las tinciones, se encuentra la de Ziehl Neelsen, empleada en el diagnóstico de enfermedades crónicas como la tuberculosis, o la tinción de azul de algodón lactofenol, que preserva e identifica a los componentes estructurales de los hongos, por mencionar algunas.

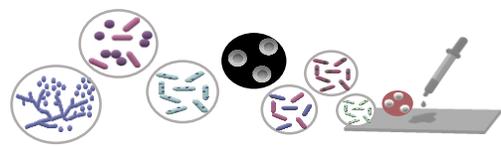
Ahora bien, se denomina tinción al proceso y resultado de colorear, por lo que en esta área consiste en teñir células. Se trata de una técnica que se emplea en los laboratorios con el objeto de optimizar la visión de aquello que se observa a través de un microscopio, por lo tanto, consiste en aplicar un colorante a una muestra para que resulte más simple analizarla.

Para la detección de los diferentes agentes infecciosos como lo son bacterias, parásitos y hongos, existe una amplia variedad de tinciones, sin embargo, en este trabajo únicamente se tratarán las tinciones básicas que se utilizan en el Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas de noveno semestre de la orientación Bioquímica Clínica de la carrera de Q.F.B., esto con el propósito de facilitar al alumno los procedimientos que se llevan a cabo, ya que se ha visto que la mayoría de los alumnos presentan dificultad para la consulta en diversas fuentes sobre los temas que involucra Microbiología Médica por la diversidad de información que se maneja por los diferentes autores (libros, artículos, manuales, guías, etc.), lo que genera confusión en ellos de cuál será la referencia que deben citar de acuerdo a las necesidades de su laboratorio.

Este libro incluye el fundamento de las tinciones básicas en el Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas, así como el paso a paso con fotografías tomadas por los mismos autores y las principales consideraciones que debe tener el estudiante de noveno semestre de la orientación de Bioquímica Clínica de la carrera de Q.F.B. de la FES Zaragoza, al momento de realizar cada tinción, además se incluyen esquemas que facilitan la comprensión de los temas a quienes empleen el libro, así como las respectivas observaciones al microscopio. Con base en lo anterior, es importante conocer la opinión acerca del libro de tinciones básicas por parte de los alumnos y profesores de noveno semestre del módulo de Bacteriología



y Micología Médicas. Al presentarse la información de manera tan práctica, se pretende que el usuario del libro comprenda el porqué y el para qué de las tinciones que está realizando. Además, este libro podrá ser útil para alumnos de otras asignaturas relacionadas con la Microbiología y para otros profesionales de la salud.



2. Marco teórico

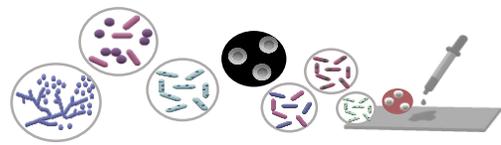
2.1 Importancia de los microorganismos

Los microorganismos juegan un papel muy importante en nuestras vidas. Algunos microorganismos causan enfermedades, pero la mayoría son completamente inofensivos. De hecho, no podríamos vivir sin ellos, pero sí podrían vivir sin nosotros (1).

Los microorganismos están presentes en casi todos los lugares de la Tierra. A pesar de su tamaño tan pequeño, tienen una gran importancia en el mantenimiento de la vida en la Tierra. Debido a la diferencia en las actividades de los diferentes microorganismos, influyen en la vida de diferentes maneras; algunos de ellos son muy útiles, por ejemplo, aquellos que fijan el nitrógeno atmosférico en formas biológicamente útiles, aquellos que degradan materia muerta, los que ayudan que en la preparación del vino, entre otros. Los biotecnólogos también pueden explotar las actividades de los microorganismos, para beneficiar a los humanos, como en la producción de medicamentos, enzimas y alimentos. También se utilizan para descomponer las aguas residuales y otros desechos tóxicos en materia segura, a lo que se le llama biorremediación, por mencionar algunos ejemplos. Por lo tanto, es esencial estudiar estos microorganismos a detalle para que, mediante diversas técnicas, se puedan superar sus efectos dañinos y se utilicen efectos benéficos para mejorar la calidad de vida en la Tierra (2).

En cuanto a las bacterias en los alimentos, como ejemplo destacado tenemos a la leche. La leche de una vaca saludable inicialmente contiene muy pocas bacterias, que provienen principalmente de la piel de la vaca y de los procedimientos para manejar la leche. La leche es un excelente medio de crecimiento para numerosas bacterias y, la cantidad de bacterias puede aumentar rápidamente a menos que la leche se procese adecuadamente. El crecimiento bacteriano puede deteriorar la leche o incluso representar un peligro grave para la salud si hay bacterias patógenas presentes. Las enfermedades que pueden transmitirse de una vaca infectada incluyen tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), fiebre ondulante (*Brucella abortus*) y fiebre Q (*Coxiella burnetii*). Además, la fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*) se puede transmitir a través de la leche de un manipulador de leche infectado (2).

Por lo tanto, podemos hablar de que el cuerpo humano es el hogar de billones de bacterias, virus y hongos. Estos microorganismos que pertenecen colectivamente a diferentes comunidades se denominan microbioma. El microbioma humano es una

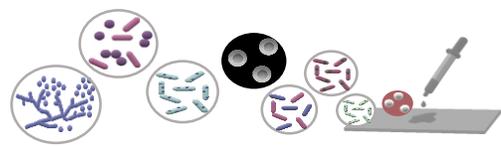


fuelle de diversidad genética y no se considera que dos microbiomas humanos sean iguales. El microbioma es un componente esencial de la inmunidad y una entidad funcional que influye en el metabolismo y modula las interacciones farmacológicas. Se sabe desde hace mucho tiempo que los microorganismos en el cuerpo humano desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la salud humana. Los microorganismos habitan en varios sitios del cuerpo humano, como la piel, la nariz, la boca y el intestino digestivo ^(3,4).

Para mantenerse saludables, los humanos necesitan microorganismos y, a su vez, muchos microorganismos necesitan un entorno específico proporcionado por el cuerpo humano para sobrevivir. Los seres humanos y los microorganismos dependen de éstas interacciones para crecer y mantenerse saludables. El hospedero humano y su flora microbiana constituyen un ecosistema complejo cuyo equilibrio sirve como un ejemplo notable de adaptación recíproca. Normalmente, los microorganismos son responsables de la resistencia a la colonización por microorganismos patógenos exógenos. Sin embargo, a veces las bacterias patógenas potenciales entran en contacto con el hospedero y son responsables de las infecciones oportunistas en hospederos inmunocomprometidos ^(3,4).

Los microorganismos que colonizan humanos son comensales, es decir, coexisten sin dañar al ser humano, mientras que otros tienen una relación mutualista con su hospedero humano, en donde ambos son beneficiosos entre sí (enfoque simbiótico). Ciertos microorganismos realizan tareas específicas conocidas por ser útiles para el hospedero humano. Sin embargo, el papel de la mayoría de los microorganismos residentes no se conoce bien. Además, según las evidencias, ahora los científicos están convencidos de que las tendencias modernas de la dieta, el uso excesivo de antibióticos, la obsesión por la limpieza, los partos por cesárea, etc., están alterando el delicado equilibrio que contribuye a algunas de las enfermedades más desconcertantes, como el asma, las alergias, la obesidad, la diabetes, enfermedades autoinmunes, cáncer e incluso autismo ^(3,4).

Mucho antes del establecimiento de la Microbiología como ciencia, el agua era sospechosa de ser portadora de organismos productores de enfermedades. Pero no fue hasta 1854, cuando se demostró que una epidemia de cólera tuvo su origen en el agua contaminada, misma que se consideró más seriamente como una fuente de enfermedad. Desde entonces, se han realizado investigaciones continuas sobre la Microbiología de los suministros públicos de agua, incluido el desarrollo de procedimientos de laboratorio para determinar si el agua es potable o segura para el consumo humano ⁽⁵⁾.



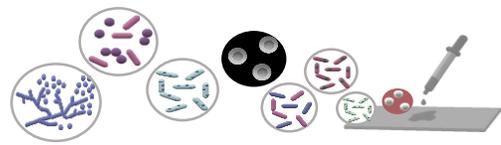
En cuanto a la Microbiología Médica y su importancia en la salud pública, se puede decir que tras el establecimiento de la teoría de los microorganismos de la enfermedad a mediados de la década de 1880 y el desarrollo de técnicas de laboratorio para el aislamiento de microorganismos (particularmente bacterias), los agentes causantes de muchas enfermedades comunes, las enfermedades fueron descubiertas en rápida sucesión. Algunas enfermedades comunes y la fecha de descubrimiento de su agente causante ilustran este punto: ántrax (1876), gonorrea (1879), fiebre tifoidea (1880), malaria (1880), tuberculosis (1882), difteria (1883), cólera (1884), y el tétanos (1884). Algunos de los éxitos más notables de la Microbiología Médica incluyen el desarrollo de vacunas a partir de la década de 1790, los antibióticos a mediados del siglo XX y la erradicación mundial de la viruela en 1977 ⁽⁵⁾.

Como se puede ver, existe una amplia variedad de microorganismos, tratados desde diferentes puntos de vista, sin embargo, no dejan de ser un tema de interés de estudio. Tales microorganismos se presentan en una sorprendente variedad de formas y tamaños, clasificándose principalmente en; bacterias, virus, hongos, protozoos, algas y archaeas. No obstante, son para nuestro interés el estudio principalmente de bacterias y hongos, debido a que a estos microorganismos son a los que se les realiza tinciones en el Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas de la carrera de Q.F.B., de noveno semestre del área terminal de Bioquímica Clínica, de la FES Zaragoza UNAM.

2.2 Historia de la Microbiología y la importancia de las tinciones

La Microbiología es la ciencia encargada del estudio y análisis de los microorganismos u organismos microscópicos. A su vez, ésta se clasifica en ramas, como lo son: Bacteriología; siendo el estudio de bacterias, Virología; estudio de virus, Protozoología; estudio de protozoos, Micología; estudio de hongos, Ficología o Algología; estudio de las algas ⁽⁶⁾.

El descubrimiento en el siglo XVII de formas de vida invisibles a simple vista fue un hito importante en la historia de la ciencia, ya que a partir del siglo XIII se había postulado que las entidades "invisibles" eran responsables de la decadencia y la enfermedad. La palabra "microorganismo" fue acuñado en el último cuarto del siglo XIX para describir estos organismos, todos los cuales se pensaba que estaban relacionados. A medida que la Microbiología finalmente se convirtió en una ciencia



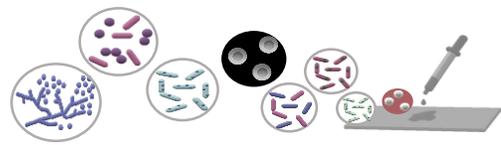
especializada, se descubrió que los microbios son un grupo muy grande de organismos extremadamente diversos ⁽⁷⁾.

Además de poblar las superficies internas y externas del cuerpo humano, los microorganismos, abundan en el suelo, en los mares y en el aire. Los abundantes microorganismos, aunque generalmente pasan desapercibidos, proporcionan una amplia evidencia de su presencia, a veces de manera desfavorable, como cuando causan la descomposición de los materiales o causan enfermedades y, a veces de manera favorable, como cuando fermentan el azúcar en el vino y la cerveza, hacen que el pan aumente, condimenten los quesos y producir productos de valor como los antibióticos y la insulina, etc ⁽⁷⁾.

La Microbiología comenzó esencialmente con el desarrollo del microscopio. Aunque otros hayan visto microorganismos antes que él, fue Antonie van Leeuwenhoek, un pañero holandés cuya afición era el afilado de lentes y la fabricación de microscopios, fue el primero en proporcionar la documentación adecuada de sus observaciones. Sus descripciones y dibujos incluían protozoos de las entrañas de animales y bacterias de raspados de dientes. Sus registros fueron excelentes porque produjo lentes de aumento de calidad excepcional. Leeuwenhoek transmitió sus hallazgos en una serie de cartas a la Sociedad Real Británica. A mediados de la década de 1670. Aunque sus observaciones estimularon mucho interés, nadie hizo un intento serio de repetir las o extenderlas. Los "animalcules" de Leeuwenhoek, como los llamaba, eran rarezas de la naturaleza para los científicos de su época, y el entusiasmo por el estudio de los microbios creció lentamente. Solo más tarde, durante el resurgimiento en el siglo XVIII de una controversia sobre si la vida podía desarrollarse a partir de material no vivo, se hizo evidente la importancia de los microorganismos en el esquema de la naturaleza y en la salud y el bienestar de los humanos ⁽⁷⁾.

Posteriormente, se habló de la "Generación espontánea" versus "Generación de vida biótica". Los primeros griegos creían que los seres vivos podían originarse a partir de materia no viva (abiogénesis) y que la diosa Gea podía crear vida a partir de piedras. Aristóteles descartó esta idea, pero aún sostenía que los animales podían surgir espontáneamente de organismos diferentes o del suelo. Su influencia sobre este concepto de la generación espontánea todavía se sentía hasta el siglo XVII, pero hacia fines de ese siglo comenzó una cadena de observaciones, experimentos y argumentos que finalmente refutaron la idea ⁽⁷⁾.

A pesar de que Francesco Redi, un médico italiano, refutó en 1668 que las formas de vida más elevadas podían originarse de manera espontánea, los defensores del concepto afirmaron que los microorganismos eran diferentes y que efectivamente



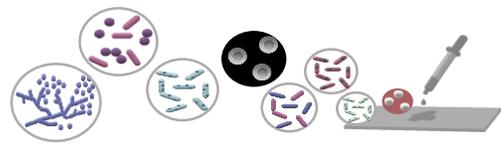
surgían de esta manera. Nombres ilustres como John Needham y Lazzaro Spallanzani fueron adversarios en este debate a mediados del siglo XVIII. En la primera mitad del siglo XIX, Franz Schulze y Theodor Schwann fueron figuras importantes en el intento de refutar las teorías de la abiogénesis hasta que Louis Pasteur finalmente anunció los resultados de sus experimentos concluyentes en 1864. En una serie de experimentos magistrales, Pasteur demostró que solo los microorganismos preexistentes podrían dar lugar a otros microorganismos (biogénesis). El conocimiento moderno y preciso de las formas de bacterias se puede atribuir al botánico alemán Ferdinand Cohn, cuyos resultados principales se publicaron entre 1853 y 1892. La clasificación de bacterias de Cohn, publicada en 1872 y ampliada en 1875, dominó el estudio de estos organismos a partir de entonces ⁽⁷⁾.

En cuestión de los microorganismos y la enfermedad, Girolamo Fracastoro, un erudito italiano, adelantó la idea, ya a mediados del 1500, que el contagio es una infección que pasa de una cosa a otra. Una descripción de lo que se pasa a lo largo del eludido descubrimiento hasta finales de 1800, cuando el trabajo de muchos científicos, Pasteur entre ellos, determinó el papel de las bacterias en la fermentación y la enfermedad. Robert Koch, un médico alemán, definió el procedimiento (los postulados de Koch) para probar que un organismo específico causa una enfermedad específica ⁽⁷⁾.

El fundamento de la Microbiología se colocó de manera segura durante el período de aproximadamente 1880 a 1900. Los estudiantes de Pasteur, Koch y otros descubrieron en una sucesión rápida una gran cantidad de bacterias capaces de causar enfermedades específicas (patógenos). También elaboraron un extenso arsenal de técnicas y procedimientos de laboratorio para revelar la ubicuidad, la diversidad y las capacidades de los microbios ⁽⁷⁾.

Posteriormente, en el siglo XX, surgieron ciertos avances, todos estos ocurrieron en Europa. No fue hasta principios del siglo XX que la Microbiología se estableció en América. Muchos microbiólogos que trabajaron en América en este momento habían estudiado con Koch o en el Instituto Pasteur de París. Una vez establecida en América, la Microbiología floreció, especialmente con respecto a disciplinas relacionadas como la Bioquímica y la Genética. En 1923, el bacteriólogo estadounidense David Bergey estableció la referencia principal de la ciencia, cuyas ediciones actualizadas se siguen utilizando en la actualidad ⁽⁷⁾.

Desde la década de 1940, la Microbiología ha experimentado un período extremadamente productivo durante el cual se han identificado muchos microorganismos causantes de enfermedades y se han desarrollado métodos para



controlarlos. Los microorganismos también se han utilizado eficazmente en la industria; Sus actividades se han canalizado en la medida en que los productos valiosos son ahora vitales y comunes ⁽⁷⁾.

El estudio de los microorganismos también ha mejorado el conocimiento de todos los seres vivos. Los microorganismos son fáciles de trabajar y, por lo tanto, proporcionan un vehículo simple para estudiar los complejos procesos de la vida; como tales, se han convertido en una herramienta poderosa para estudios en genética y metabolismo a nivel molecular. El conocimiento del metabolismo básico y los requerimientos nutricionales de un patógeno, por ejemplo, a menudo conduce a un medio para controlar la enfermedad o infección ⁽⁷⁾.

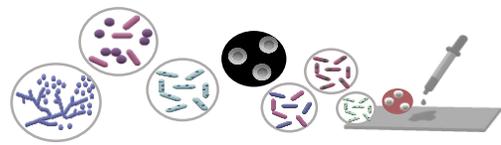
Para el estudio de tales microorganismos es necesario tener presentes las características que los definen, como es el caso de la morfología, la cual se refiere al tamaño, forma y disposición de las células. La observación de células microbianas requiere no solo el uso de microscopios, sino también la preparación de las células de una manera apropiada para el tipo particular de microscopía. Durante las primeras décadas del siglo XX, el microscopio de luz compuesto fue el instrumento comúnmente utilizado en Microbiología. Los microscopios de luz tienen un factor de ampliación habitual de 1000X y una ampliación útil máxima de aproximadamente 2000X. Las muestras pueden observarse después de haber sido teñidas por una de varias técnicas para resaltar algunas características morfológicas o en preparaciones vivas sin teñir como un "montaje húmedo" ⁽⁷⁾.

2.3 Historia del microscopio

Durante el siglo I d. C. (año 100), se inventó el vidrio y los romanos lo miraron y lo probaron. Experimentaron con diferentes formas de vidrio transparente y una de sus muestras era gruesa en el medio y delgada en los bordes. Descubrieron que, si sostenía una de estas "lentes" sobre un objeto, el objeto se vería más grande ⁽⁸⁾.

Estas lentes tempranas fueron llamadas lupas o lentes quemadas. Por cierto, la palabra lente se deriva de la palabra latina lenteja, ya que se denominaron porque se asemejaban a la forma de un frijol de lenteja. Estas lentes no se usaron mucho hasta finales del siglo XIII, cuando los fabricantes de gafas producían lentes para usar como gafas ⁽⁸⁾.

Los primeros "microscopios" simples, que en realidad eran solo lupas, tenían una potencia, generalmente de aproximadamente entre 6X y 10X. Una cosa que era



muy común e interesante a la vista eran las pulgas y otros pequeños insectos. Estas lupas tempranas fueron por lo tanto llamadas "gafas de pulgas" ⁽⁸⁾.

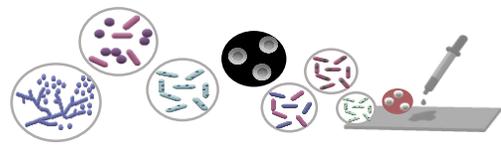
En algún momento del año 1590, dos fabricantes de espejos holandeses, Zaccharias Janssen y su padre Hans comenzaron a experimentar con estas lentes. Pusieron varias lentes en un tubo e hicieron un descubrimiento muy importante, en el cual se observaba que el objeto cerca del extremo del tubo parecía estar muy agrandado, mucho más grande de lo que cualquier simple lupa podría lograr por sí mismo. Acababan de inventar el microscopio compuesto (microscopio que usa dos o más lentes) ⁽⁸⁾.

Galileo escuchó de sus experimentos y comenzó a experimentar por su cuenta. Describió los principios de las lentes y los rayos de luz y mejoró tanto el microscopio como el telescopio. Añadió un dispositivo de enfoque a su microscopio y, por supuesto, siguió explorando los cielos con sus telescopios ⁽⁸⁾.

Antonie Leeuwenhoek de Holanda se interesó mucho por las lentes mientras trabajaba con lupas en una tienda de productos secos. Usó la lupa para contar hilos en tela tejida. Se interesó tanto que aprendió a hacer lentes. Al moler y pulir, pudo hacer pequeñas lentes con grandes curvaturas. Estas lentes redondas produjeron un mayor aumento y sus microscopios pudieron ampliar hasta 270X. Se involucró más en la ciencia y con su nuevo microscopio mejorado pudo ver cosas que ningún hombre había visto antes: bacterias, levaduras, células sanguíneas y muchos animales diminutos nadando en una gota de agua. A partir de sus grandes contribuciones, muchos descubrimientos y trabajos de investigación, Anthony Leeuwenhoek (1632-1723) ha sido llamado desde entonces el "Padre de la microscopía" ⁽⁸⁾.

Robert Hooke, un inglés (que a veces se llama el "Padre inglés de la microscopía"), también pasó gran parte de su vida trabajando con microscopios y mejoró su diseño y capacidades. Poco se hizo para mejorar el microscopio hasta mediados del siglo XIX, cuando se hicieron grandes avances y surgieron instrumentos de calidad como el microscopio de hoy. Compañías en Alemania como Zeiss y una compañía estadounidense fundada por Charles Spencer comenzaron a producir instrumentos ópticos finos ⁽⁸⁾.

Actualmente, no hay fabricantes de microscopios en los E.U.A. y la mayoría de los microscopios provienen de Alemania, Japón y China. Deben evitarse los microscopios plásticos de juguete ya que no alcanzan el nivel de calidad de los instrumentos básicos con marcos de metal y lentes de vidrio ⁽⁹⁾.



Debido a la producción extranjera, los microscopios de calidad se han vuelto asequibles para todos. Zaccharias Janssen, el inventor del microscopio, se sorprendería de la calidad de incluso los microscopios más básicos que se encuentran en las escuelas hoy en día ⁽⁹⁾.

2.4 Fundamentos de microscopía óptica

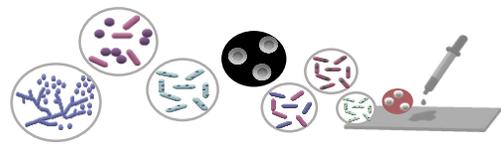
En general, la microscopía se utiliza en Microbiología con dos propósitos básicos: la detección inicial de microorganismos y la identificación preliminar o definitiva de los mismos. El examen microscópico de muestras clínicas se utiliza para detectar células bacterianas, elementos micóticos, parásitos (huevos, larvas o formas adultas) e inclusiones víricas presentes en las células infectadas. Las propiedades morfológicas características se pueden utilizar para la identificación preliminar de la mayoría de las bacterias y se utilizan para la identificación de muchos hongos y parásitos ⁽⁹⁾.

Para el examen microscópico de los microorganismos se puede utilizar el microscopio óptico o el microscopio electrónico. Así mismo, para la detección de los microorganismos es importante aplicar algún método de tinción para su posterior observación en el microscopio, ya que esta es la base para después poder realizar la inoculación de la bacteria u hongo en algún medio de cultivo ⁽¹⁰⁾.

2.5 El microscopio

El microscopio es un instrumento que produce imágenes agrandadas de objetos pequeños, lo que permite al observador una vista extremadamente cercana de las estructuras diminutas en una escala conveniente para el examen y análisis. El microscopio puede proporcionar una imagen dinámica (como con los instrumentos ópticos convencionales) o una que sea estática (como con los microscopios electrónicos de barrido convencionales) ⁽¹⁰⁾.

Todos los microscopios utilizan lentes para aumentar la imagen de una célula de modo que se puedan observar sus detalles estructurales. Además del aumento, es importante la resolución de un microscopio, que es una medida del detalle más pequeño del objeto que se puede observar y es la propiedad que permite observar dos puntos adyacentes como puntos separados ⁽¹⁰⁾.



2.5.1 Microscopio óptico

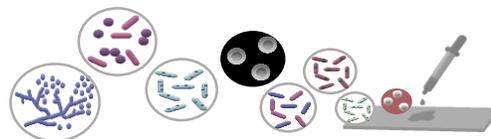
El tipo de microscopio más conocido es el microscopio óptico, de luz o de campo claro, en el que se usan lentes de vidrio para formar la imagen. En general, el microscopio óptico se usa para observar estructuras internas o detalles de las superficies celulares ⁽¹⁰⁾.

Los microscopios ópticos pueden ser simples, consistiendo en una sola lente, o compuesto, consistiendo en varios componentes ópticos en línea. La lupa de mano puede magnificar alrededor de 3 a 20X. Los microscopios simples de lente única pueden aumentar hasta 300X y son capaces de revelar bacterias, mientras que los microscopios compuestos pueden aumentar hasta 2,000X. Un microscopio simple puede resolverse por debajo de 1 micrómetro (μm ; una millonésima de metro); un microscopio compuesto puede resolver hasta aproximadamente $0.2 \mu\text{m}$ ⁽¹⁰⁾.

Las imágenes de interés se pueden capturar mediante fotografía a través de un microscopio, una técnica conocida como fotomicrografía. Desde el siglo XIX, esto se hizo con película, pero en su lugar ahora se usa mucho la imagen digital. Algunos microscopios digitales han prescindido de un ocular y proporcionan imágenes directamente en la pantalla del ordenador. Esto ha dado lugar a una nueva serie de microscopios digitales de bajo costo con una amplia gama de posibilidades de imágenes, incluida la micrografía de lapso de tiempo, que ha puesto al alcance del microscopía joven o aficionado las tareas previamente complejas y costosas ⁽¹⁰⁾.

En la microscopía óptica, toda la luz desde el espécimen y los alrededores es recolectada por el objetivo para formar una imagen contra un fondo brillante. El espécimen generalmente se tiñe y se observa mientras está iluminado. En otras palabras, se trata de la forma más simple de microscopía, en la cual la luz pasa a través del espécimen. Además, su iluminación no se altera por aditamentos que cambien las propiedades de la luz como por ejemplo con polarizadores, filtros o algo semejante. Estamos muy familiarizados con este tipo de microscopía debido a que es el más utilizado, en donde además, el espécimen es iluminado desde abajo y observado desde arriba ⁽¹¹⁾.

Cabe mencionar que existen otros tipos de microscopios, pero se hace énfasis en el microscopio óptico debido a que es el que se emplea en el libro. Sin embargo, se ha hecho una recopilación con las características principales de algunos de los otros microscopios en comparación con el microscopio óptico, lo cual se puede observar en el cuadro 1.

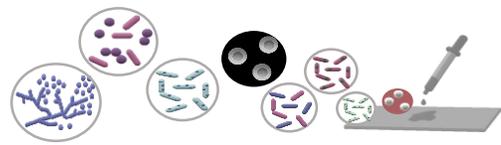


Microscopio	Características	Utilidad
Óptico, de campo claro o de luz	-Luz visible -Hasta 0.23 μm -Muestra sobre un fondo brillante	-Tinciones -Fácil utilización -Características morfológicas generales de bacterias, hongos, algas y protozoos.
De campo oscuro	-Luz visible difractada -Muestra brillante sobre un fondo oscuro.	-Microorganismos de difícil tinción -Determinar la motilidad de microorganismos o algunas características morfológicas especiales
De contraste de fases	-Luz difractada -Muestra con diferentes grados de brillo y contraste	-Estructuras internas de las células -Organismos vivos y sin teñir
De fluorescencia	-Luz ultravioleta -Muestra fluorescente sobre un fondo no fluorescente	-Inmunofluorescencia -Auramina
Electrónico	-Haces de electrones -Estructuras menores de 0.23 μm	-Virus -Ultraestructuras

Cuadro 1. Características y utilidad de los microscopios más comunes ⁽¹¹⁾.

Ahora bien, es necesario conocer las partes principales que conforman a un microscopio, para de esta manera poder ejecutarlo adecuadamente y evitar cualquier tipo de daño que se le pueda causar por un mal uso. Estas son ⁽¹²⁾:

- Pie: Tiene la función de soportar el resto del microscopio y está formado por una estructura metálica pesada.
- Platina: Se trata de la estructura que sostiene la muestra que se desea observar.
- Tubo: En este se encuentra instalado el sistema óptico, siendo generalmente binoculares (dos oculares) que facilitan la visión con los dos ojos y los revólveres portaobjetivos, con los que se pueden cambiar los objetivos instantáneamente, sin necesidad de desenfocar la muestra. El enfoque se



- realiza a través de unos tornillos conocidos como “tornillos macrométricos” y “tornillos micrométricos”, que permiten desplazamientos verticales gruesos y finos, respectivamente.
- **Objetivos:** Estos son los que se encuentran insertados en el revólver del microscopio, distinguiéndose principalmente dos tipos:
 - Objetivos en seco: En estos, el aire se interpone entre la lente y el preparado. Los objetivos más comúnmente utilizados son de 4X, 10X y 40X.
 - Objetivos de inmersión: Se distinguen de los anteriores porque entre la lente y el preparado se debe interponer un medio transparente con un índice de refracción (n) superior al del aire ($n = 1$), y semejante al del vidrio ($n = 1,5$). El medio utilizado es un aceite de inmersión, como por ejemplo el aceite de cedro. Son aptos para la observación de bacterias, finas estructuras, etc.
 - **Ocular:** Permite observar la imagen del objeto formada por el objetivo, actuando como una lupa. Está compuesta por dos lentes: la inferior o colectora, y la superior, o lente ocular.
 - **Sistema de iluminación:** Situado debajo de la platina, está formado por:
 - Lámpara o espejo de iluminación.
 - Condensador: Posee la función de concentrar sobre el preparado los rayos luminosos procedentes de la fuente de luz.
 - Diafragma: Situado debajo del condensador, sirve para graduar la cantidad de luz que llega al objeto.
 - Filtros de luz: Son placas de vidrios, coloreadas, que dejan pasar las radiaciones de longitud de onda deseadas, absorbiendo las restantes.

Los componentes anteriormente mencionados se pueden observar en la figura 1.

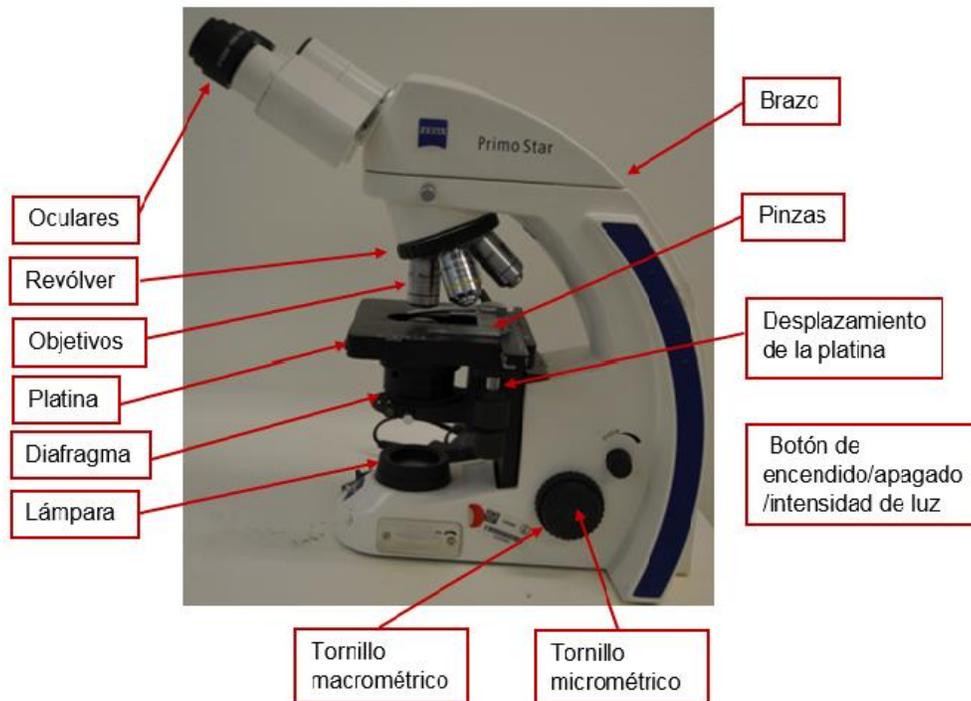
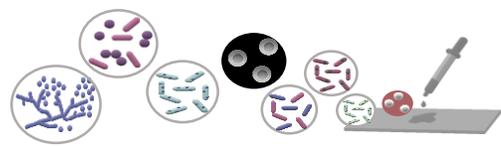


Figura 1. Componentes de un microscopio *.

2.5.2 Características de un microscopio

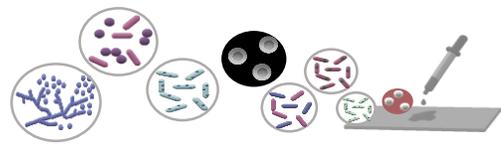
Tres factores son necesarios para ver los microorganismos al microscopio: aumento (o amplificación), resolución y contraste ⁽¹³⁾.

2.5.2.1 Resolución

Se trata de la capacidad de producir imágenes independientes de pequeñas partes de un objeto que se encuentran a poca distancia, en otras palabras, se trata de la capacidad para distinguir los detalles finos. La resolución se expresa en unidades lineales, generalmente micrómetros (μm) ⁽¹³⁾.

La resolución, o la medida en que se define el detalle de un objeto magnificado, es un componente necesario también, ya que el poder de resolución de un microscopio debe permitir que dos células aparezcan como objetos distintos para identificarlos. Para los microscopios de luz, el poder de resolución es máximo cuando se coloca aceite entre la lente del objetivo y el frotis para evitar que los rayos de luz se dispersen a medida que pasan a través del frotis ⁽¹³⁾.

* Fotografía tomada por los autores.



El aumento total con el lente con aceite de inmersión es 1,000 veces el aumento original. Este aumento y capacidad de resolución son necesarios para observar a las bacterias ⁽¹³⁾.

1.5.2.2 Contraste

En microscopía, el contraste se refiere a la diferencia que existe entre el área de interés (bacteria, hongo, etc.) con respecto al fondo en una imagen observada en el microscopio. Ésta diferencia está establecida por las diferencias entre los puntos más brillantez y oscuros o por la diferencia en color ⁽¹⁴⁾.

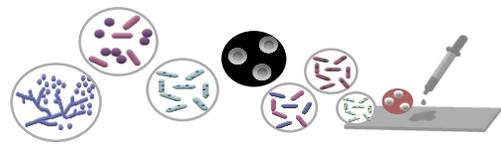
El contraste dependerá de lo que se esté analizando bajo el microscopio, por lo tanto, considerando esto se presentarán diferentes contrastes. Las células vivas, por ejemplo, son muy traslucidas y no muy coloreadas, haciendo difícil distinguir sus características específicas. Creando contraste en el espécimen será posible que el observador pueda identificar las estructuras clave. Esto se puede lograr con la manipulación de la iluminación del microscopio, sin embargo, muchas veces esto no es suficiente, por lo que se hace uso de colorantes, de ahí la importancia de las técnicas de tinción ⁽¹⁴⁾.

En resumen, la percepción de un objeto bajo el microscopio depende del hecho de que muestre cierto grado de contraste con el medio circundante, como resultado de que a través de él se transmite menos luz del medio. Por lo tanto, para aumentar el grado de contraste se utilizan procedimientos de tinción ⁽¹⁵⁾.

2.5.2.3 Aumento

El poder de aumento de un microscopio es una expresión de la cantidad de veces que el objeto que se examina parece agrandarse y es una proporción adimensional. Para tener un microscopio que cumpla con nuestras necesidades satisfactoriamente es muy importante que tenga suficiente poder de aumento. Dicho aumento focal suele representarse con el signo X después de un número, por ejemplo 5X, 10X en los oculares y 10X, 43X en los objetivos. En otras palabras, el aumento para la microscopía óptica es el producto del lente objetivo (generalmente 10X, 20X, 40X o 100X) y la lente ocular o el ocular (10X). Por lo tanto, la apariencia de objetos observados a baja potencia, como 10X, sería el producto de 10 por 10 o 100 veces el tamaño original ^(10,16).

Es instintivo, cuando uno desea examinar los detalles de un objeto, acercarlo lo más posible al ojo. Cuanto más cerca esté el objeto del ojo, mayor será el ángulo que subtende en el ojo y, por lo tanto, más grande aparecerá el objeto. Sin embargo, si



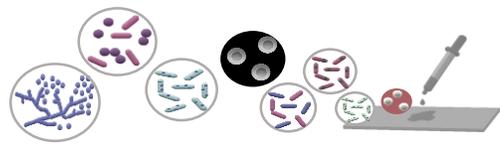
un objeto se acerca demasiado, el ojo ya no puede formar una imagen clara. El uso de la lente de aumento entre el observador y el objeto permite la formación de una "Imagen virtual" que puede verse con comodidad. Para obtener la mejor imagen posible, la lupa debe colocarse directamente delante del ojo. El objeto de interés se lleva hacia el ojo hasta que se ve una imagen clara del objeto. Aunque el aumento se puede incrementar prácticamente sin límite, no ocurre lo mismo con la resolución, que está limitada por las propiedades físicas de la luz ^(10,16).

2.5.2.4 Oculares

Otra característica es la cantidad de oculares. Existen microscopios que tienen dos oculares, es decir, binoculares y, otros que tienen un solo ocular, monoculares. La diferencia más destacada entre ellos es la comodidad que brinda cada uno. Por ejemplo, si se va a utilizar el microscopio por tiempos prolongados es preferible emplear un microscopio binocular, debido que el uso prolongado de microscopios monoculares genera dolor de cabeza y fatiga visual en muchas personas. Estos últimos deberían emplearse únicamente para personas que lo utilizarán por un período de tiempo reducido ⁽¹⁵⁾.

2.5.2.5 Objetivos

Este sistema se integra con varios lentes; la lente que queda más cerca del objeto a analizar es la inferior y se le denomina lente frontal, es plano convexa y su diámetro es más pequeño cuanto mayor sea el aumento que proporcione. Los objetivos producen el aumento de las imágenes de los objetos de estudio. Los más habituales son de 2 tipos: secos y de inmersión. Los primeros son los más empleados, se utilizan sin colocar alguna sustancia entre objetivos y la preparación, pues entre la lente frontal del objetivo y la preparación sólo hay aire, su número de objetivos depende de cada microscopio, pero los más frecuentes son: 6X, 10X, 20X, 45X y 60X. Por su parte, el objetivo de inmersión está conformado por un complejo sistema de lentes y requieren de la presencia de un líquido entre la lente frontal y la preparación, cuyo índice de refracción debe ser el adecuado para permitir una mayor luminosidad, por lo cual es necesario colocar una gota de aceite (generalmente de cedro) entre el objetivo y la preparación, de manera que la lente entre en contacto con dicho aceite, el cual se coloca con el propósito de concentrar los rayos de luz que provienen el foco luminoso, siendo los objetivos para este caso los de 100X. Los lentes objetivos son partes delicadas y cualquier golpe podría dañarlas, por lo que se debe tratarlas con precaución ^(17, 18).

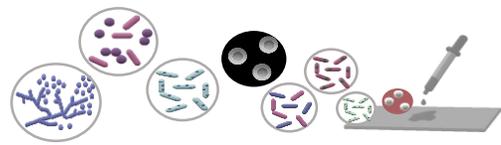


2.5.3 Cuidado del microscopio

El microscopio es un valioso instrumento. Para que pueda servir eficazmente año tras año, es necesario que se le otorgue el cuidado adecuado. Por este motivo, se deben recordar las siguientes indicaciones ^(19,20):

- a) Enchufar y posteriormente encender el microscopio.
- b) Colocar la preparación en la platina del microscopio.
- c) Primero se debe colocar el objetivo de menor aumento, ya que permitirá la observación de una panorámica del preparado y así tener una ubicación de las zonas de interés para su posterior análisis. Posteriormente, podrán emplearse los objetivos de mayor aumento.
- d) Evitar mover el microscopio cuando la lámpara se encuentre encendida, debido a que el filamento de dicha lámpara es muy sensible.
- e) Para desplazarlo hacia otro lugar se deben emplear los correspondientes tornillos de fijación que posee el microscopio. Procurar que los movimientos no sean muy rápidos.
- f) No se debe tocar las lentes de los oculares y objetivos con los dedos, con el fin de evitar ensuciarlos con la grasa natural que se tiene en las manos.
- g) Retirar la preparación del microscopio.
- h) Después de usar el microscopio, debe limpiarse cuidadosamente y sin tallar, con el papel adecuado para vidrio o papel seda, lo cual garantiza la eliminación de la suciedad excesiva en los objetivos por el uso del aceite de inmersión y a su vez, que estos no se rayen (revisar nota al final de este apartado).
- i) Verificar siempre al final de su uso que no hayan quedado preparados sobre la platina o residuos de estos.
- j) Al terminar de emplearlo, el microscopio se debe dejar con el objetivo de menor aumento, la platina lo más próxima posible a él y, protegido con la cubierta o funda protectora que le corresponda.
- k) Procurar dejar el microscopio en un mismo lugar siempre. En general, debe evitarse en lo más posible el transporte diario o constante de cualquier aparato en el laboratorio.

Nota: Si se cubren los microscopios cuando no se utilicen (las fundas de plástico son adecuadas) no tendrán que limpiarse tan a menudo. Inevitablemente se acumulará algo de polvo, suciedad y otros agentes que puedan dañarlo y esto reducirá la nitidez de las lentes. El polvo en la lente puede causar confusión, especialmente porque permanece aun cuando no se enfoque la muestra. El vidrio óptico se raya fácilmente, de modo que hay que tener cuidado cuando se limpie, para ello se debe limpiar primero el polvo suelto con un pincel blando ⁽²¹⁾.



Es preciso limpiar las partes mecánicas con un paño suave, en algunos casos éste puede humedecerse con xilol para disolver ciertas manchas de grasa, aceite de inmersión, etc. La limpieza de las partes ópticas requiere precauciones especiales: tiene que emplearse un papel muy fino y nunca deben tocarse las lentes del ocular, objetivo y condensador con los dedos, ya que las huellas digitales perjudican la visibilidad y cuando se secan resulta difícil eliminarlas. Para limpiar los objetivos se recomienda humedecer un papel de lentes con éter y suavemente pasarlo por la superficie varias veces sin realizar presión. El aceite de inmersión que queda sobre la lente frontal del objetivo de inmersión debe quitarse inmediatamente después de finalizada la observación, para lo cual puede pasarse el papel de lentes impregnado con una gota de xilol ⁽¹⁷⁾.

Es importante tomar en cuenta que los lentes de los microscopios nunca deberán limpiarse con nada distinto al papel de lentes, (fácil de adquirir en tiendas de artículos fotográficos), porque de otro modo, sufrirán daño ⁽¹⁷⁾.

2.6 Bacterias

Las bacterias son organismos de una sola célula que pueden vivir en diferentes medios. Algunas bacterias pueden sobrevivir en un ambiente ácido, como las bacterias del intestino humano y otras pueden sobrevivir en un medio salino, como las bacterias que viven en el fondo del océano. Sus tamaños pueden variar; sin embargo, la mayoría de las bacterias tienen un diámetro de alrededor de $0.2\mu\text{m}$ y una longitud de $2-8\mu\text{m}$ ⁽²²⁾.

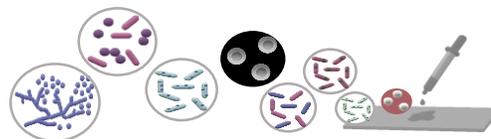
Contienen diferentes estructuras tanto internas como externas con funciones específicas, las cuales se puede observar en la figura 2.

a) Estructuras externas

- *Pared celular*

Las bacterias están protegidas por paredes celulares rígidas que forman envolturas y rodean a las células. Las paredes celulares de las bacterias están hechas de peptidoglicano, que es una cadena de polisacárido ⁽²²⁾.

-Pared celular en las bacterias Gram positivas. Las bacterias Gram positivas cuentan con una pared celular grande ($\pm 25\text{ nm}$), compuesta por una gruesa capa de peptidoglicanos en la que se pueden encontrar, intercalados en esta, componentes únicos de bacterias Gram positivas como son ácido teicoico (polímeros de glicerol o ribitol unidos a grupos fosfato) y ácido lipoteicoico (ácido



teicoico unido a lípidos desde la membrana celular). Estas estructuras de carga negativa le confieren parte de la carga negativa superficial de la bacteria, además estimulan la respuesta inmune y sirven de adhesinas para algunas bacterias ⁽²²⁾.

-Pared celular en las bacterias Gram negativas. En contraste, la pared celular de las Gram negativas es muy pequeña (± 3 nm). Esta capa delgada de peptidoglicano permite la presencia de un espacio periplásmico, el cual es importante debido a que hacia el exterior, las bacterias Gram negativas cuentan con una distintiva membrana externa ⁽²²⁾.

-Membrana externa de las bacterias Gram negativas. La capa exterior de las bacterias Gram negativas (± 7.5 nm), está compuesta por una bicapa de lípidos unida a la capa de peptidoglicano por la lipoproteína de Braun. Hacia la capa interna está formada por fosfolípidos (similar a la membrana celular) y hacia el exterior por el lípido A del lipopolisacárido (LPS). Intercaladas en la membrana externa se encuentran las proteínas hidrofóbicas denominadas "proteínas de membrana externa" (OMP). Entre la membrana externa y la pared celular existe una región denominada espacio periplásmico, en él, se encuentran: enzimas digestivas, proteínas de transporte de sustratos (fijadoras), quimiorreceptores y además pueden acumular enzimas ⁽²²⁾.

Estructura	Gram positivas	Gram negativas
Peptidoglicano	Capa gruesa	Capa delgada
Ácido teicoico	Presente	Ausente
Membrana externa	Ausente	Presente
Lipopolisacáridos	Ausente	Presente
Lipoproteínas	Ausente	Presente
Espacio periplásmico	Ausente	Presente

Cuadro 2. Diferencias estructurales entre bacterias Gram negativas y Gram positivas ⁽²³⁾.

Las estructuras que conforman de manera general a una bacteria, se ilustran en la siguiente imagen, mismas que serán explicadas más adelante:

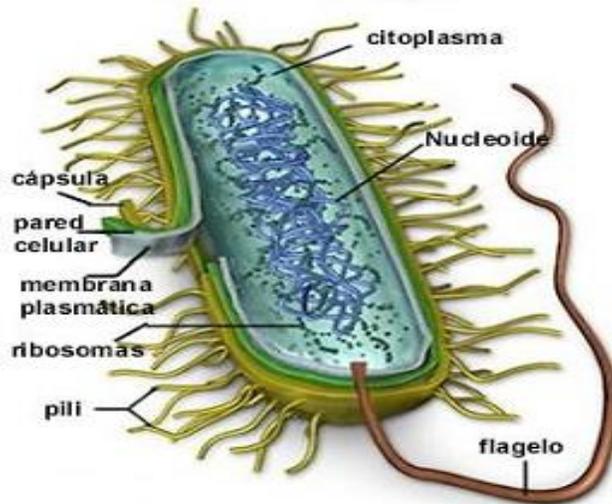
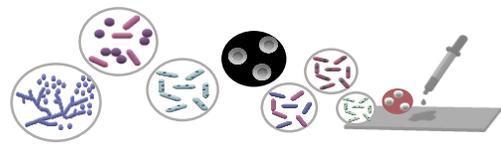


Figura 2. Estructuras generales de las bacterias ⁽²⁴⁾.

- *Cápsula*

Las cápsulas están presentes principalmente en bacterias patógenas. La función principal de una cápsula es proteger la bacteria del sistema inmunológico del huésped (el organismo en el que la bacteria puede crecer y vivir) ⁽²⁵⁾.

- *Estructuras de locomoción*

Entre las estructuras más comunes de locomoción se encuentran los flagelos, los cuales no necesariamente están presentes en todas las bacterias. Los microorganismos que las poseen tienen la capacidad de motilidad. Los flagelos son estructuras delgadas de alrededor de 20 μm , pero largos (3 a 12 μm), apéndices filamentosos ondulados. Una bacteria puede tener un flagelo o un grupo de flagelos ⁽²⁵⁾.

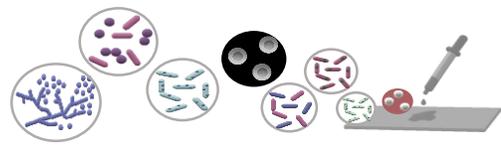
b.) Estructuras internas

- *Ribosomas*

Los ribosomas son pequeñas partículas que se encuentran en el citoplasma. Son los sitios donde se lleva a cabo la traducción del ARNm, y también son responsables de la síntesis de proteínas ⁽²⁵⁾.

- *Mesosomas*

Estas son las invaginaciones plegadas que están presentes en la membrana plasmática. Estas invaginaciones son importantes para la respiración celular de la célula ⁽²⁵⁾.



- *Nucleoide*

En el nucleoide bacteriano, las moléculas de ADN y ARN agregadas están presentes. Aparte del ADN y el ARN, las bacterias también contienen plásmidos. Los plásmidos son los fragmentos de ADN circular ubicados en un sector de la célula, fuera de la región nucleada. ⁽²⁵⁾.

La morfología a observar en el microscopio, dependerá del microorganismo en estudio, sin embargo, de manera general, se puede decir que existen estructuras en común para la mayoría de las bacterias. A diferencia de los hongos, los cuáles son más variados en cuanto a sus estructuras, por lo que en estos sí es preciso explicarlo por separado dependiendo de cuál se trate.

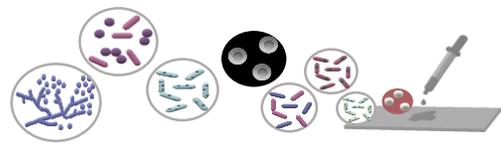
A continuación, se tratará la morfología bacteriana en general y más adelante se detallarán ciertas características específicas de las bacterias que fueron empleadas en este trabajo y de otras más que no fueron utilizadas en el trabajo pero que son muy representativas de cada tinción.

Cuando se indaga en las particularidades de la morfología bacteriana, los textos destacan la existencia de estructuras esenciales: nucleoide (que determina la cualidad distintiva de las bacterias dentro del universo viviente), citoplasma, membrana citoplasmática y pared celular. Hay otras estructuras, a diferencia de las anteriores, pueden o no estar presentes; pueden incluso perderlas y ello no implica la muerte al microorganismo, de ahí que se les designe como estructuras no esenciales ⁽²⁵⁾.

2.6.1 Morfología y agrupación microscópica bacteriana

Entre las principales características de las bacterias se encuentran su tamaño, forma, estructura y tipo o modo de agrupación. Todas estas características van a constituir la morfología propia de las células bacterianas, mismas que se enlistan a continuación ⁽²⁶⁾:

- a. **Tamaño.**
- b. **Forma.**
- c. **Agrupación.**
- d. **Otras.**



2.6.1.1 Tamaño

Es una característica para cada tipo bacteriano; se puede medir con gran exactitud y fiabilidad a pesar de que sólo puede observarse la bacteria al microscopio. El tamaño generalmente es muy pequeño (entre 0.1 y 4 micras). Conocer al menos su forma y tipo de agrupación va a ser esencial y previo a cualquier proceso de identificación y clasificación taxonómica como se verá a continuación ⁽²⁶⁾.

2.6.1.2 Forma

Con respecto a la forma que va a presentar esa bacteria como organismo individual se ha de considerar que las bacterias suelen adoptar fundamentalmente alguna de las formas siguientes ⁽²⁶⁾:

- a. *Oval o esférica* (0.5 a 1 μm). Denominadas “cocos” (del griego y latín “baya”). Muchos de estos microorganismos presentan diferentes formas de agrupación, hecho que es muy útil para su identificación.
- b. *Cilíndrica o en forma de bastón* (0.5 a 20 μm). Denominadas “bacilos” (en latín “bastón”). Algunos de estos bacilos tienden a agruparse, aunque con menos tendencia que en el caso de las formas cocoides.
- c. *Espiral o helicoidal* (1 a 100 μm). Cuando las bacterias adoptan formas espirales recibe el nombre de espirilo; en estos casos predominan las células individuales y más o menos aisladas. Dichas formas también se llaman sacacorchos o espiroquetas y son muy características de ciertas especies. En general hay muchas diferencias en cuanto a la longitud de este tipo de bacterias, el número de espiras y la amplitud de cada una de ellas. En algunos casos son muy pequeñas con espirales muy apretadas o enrolladas y en otros casos todo lo contrario.
- d. *Filamentosa*. Cuando adoptan forman filamentosas suelen presentar al microscopio óptico un aspecto muy similar al de los hongos.
- e. *Formas intermedias de algunos casos anteriores*. Existen formas intermedias como es el caso de los cocobacilos y vibriones. Los primeros, como su nombre indica, son formas bacterianas intermedias entre cocos y bacilos, como su nombre indica, son formas bacterianas intermedias entre cocos y bacilos, que en muchos casos, más que una forma característica de una u otra especie, corresponden a la etapa inicial del desarrollo de muchos bacilos, aunque no siempre es así. Los segundos son formas curvas más o menos alargadas y, en ciertas ocasiones, algo retorcidas.

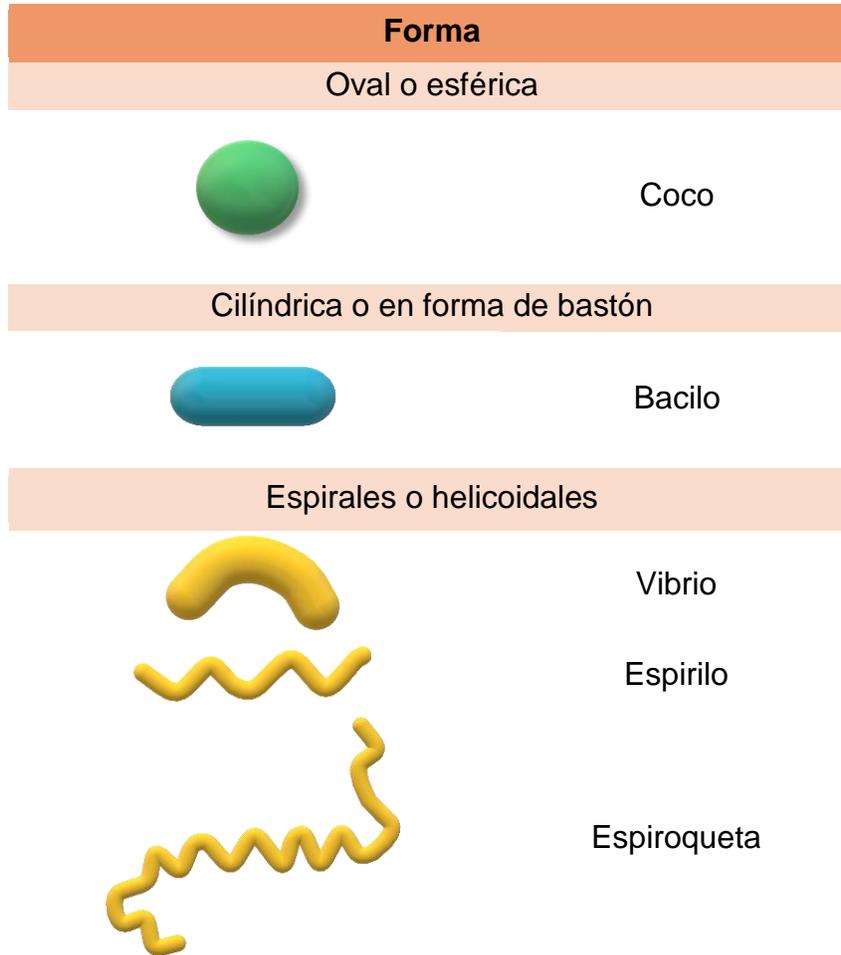
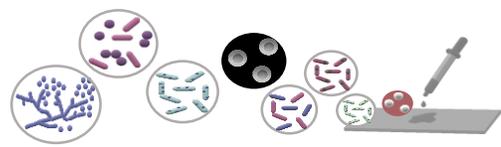
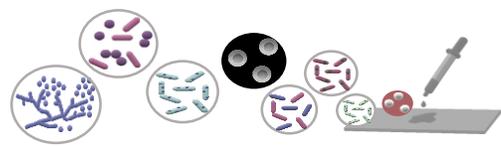


Figura 3. Formas microscópicas de bacterias **.

2.6.1.3 Agrupación

Se distinguen agrupaciones macroscópicas y microscópicas. Las primeras son visualizables a simple vista y corresponden a su crecimiento en un punto en un medio de cultivo sólido para formar colonias que serán distintas y características para cada tipo bacteriano. Las segundas son visualizables por microscopía y corresponden a lo que generalmente se entiende por agrupación bacteriana, es decir la tendencia que presentan los distintos tipos bacterianos para asociarse entre sí formando pequeños grupos de 2 o más bacterias, por ejemplo en tétradas, diplococos, racimos, cadena, etc, que con frecuencia es característico de un grupo taxonómico, por ejemplo un género ⁽²⁶⁾.

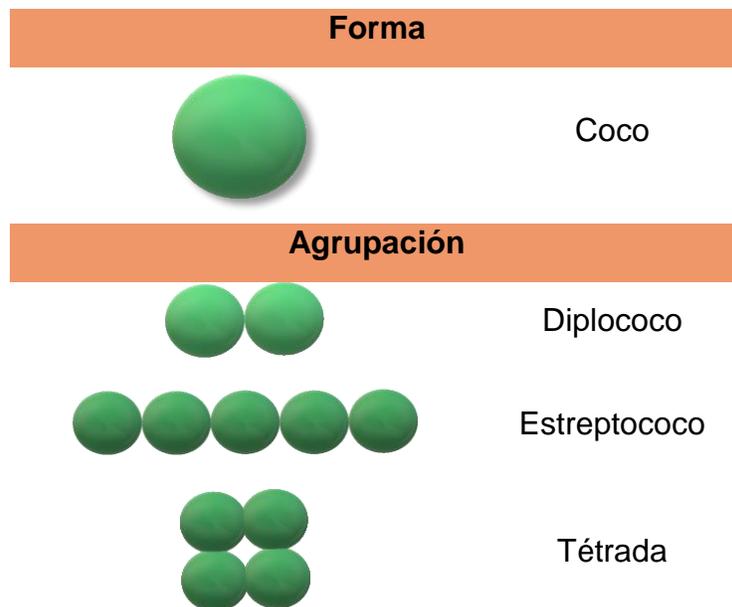
** Esquema realizado por los autores.



Con respecto a la visualización microscópica, es importante considerar que no todas las formas bacterianas se agrupan. Por el contrario, existen otras formas bacterianas donde su agrupación es muy característica y muy útil a la hora de establecer clasificaciones taxonómicas, siendo las formas cocoideas las más frecuentes en este sentido, y en menor proporción las formas bacilares ⁽²⁶⁾.

De acuerdo con lo dicho, las estructuras cocoideas se pueden agrupar de la siguiente forma ⁽²⁶⁾:

- a) Diplococos: es cuando se divide la bacteria en un plano permaneciendo unidos en forma de parejas.
- b) Estreptococos: es cuando la bacteria se divide en planos paralelos quedando unidos entre si formando cadenas.
- c) Tétradas o tetracocos: es cuando la bacteria se divide en dos planos perpendiculares entre sí formando grupos característicos de 4 células.
- d) Estafilococos: es cuando la división tiene lugar en 3 planos distintos formando como consecuencia de esto racimos de cocos.
- e) Sarcinas: esta agrupación se forma como consecuencia de la división de la bacteria en 3 planos perpendiculares originando agrupaciones cuboidales de en torno a 8 cocos o más ⁽²⁶⁾, como se observa en la figura 4.



Continúa en la siguiente página

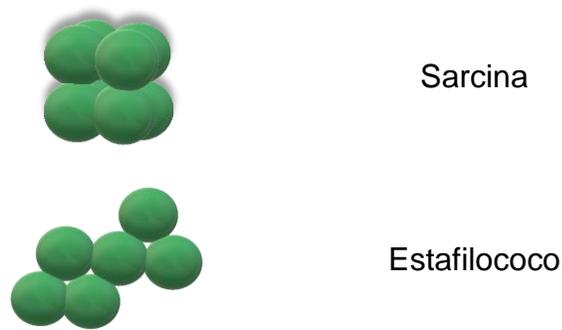
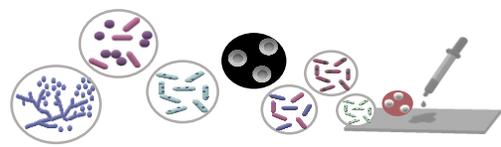


Figura 4. Agrupaciones de tipo cocoideo **.

Las agrupaciones bacilares son menos frecuentes pero, pero en ocasiones, pueden aparecer como ⁽²⁶⁾:

- a) Diplobacilos: corresponden a dos bacilos unidos como pareja y originados por la división en un mismo plano.
- b) Estreptobacilos: son agrupaciones de bacilos a modo de cadenas.
- c) Formas irregulares: en ocasiones los bacilos pueden agruparse adquiriendo formas muy irregulares análogas a las letras chinas. Este tipo de asociación es característico del género *Corynebacterium* (Figura 5).

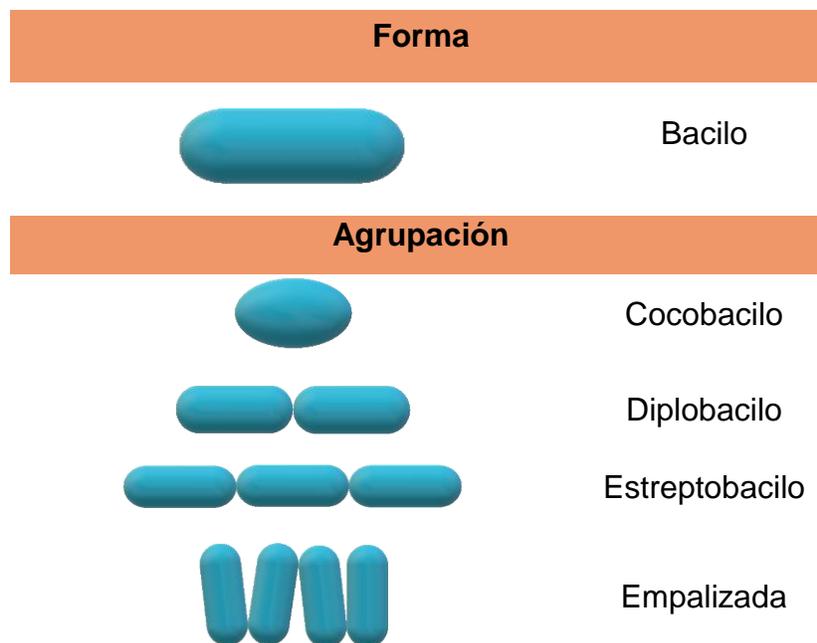
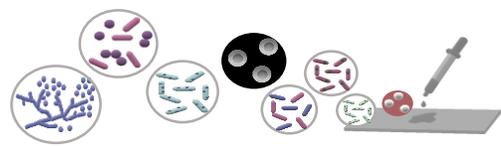


Figura 5. Agrupaciones de bacilos **.

** Esquema realizado por los autores.



2.6.1.4 Otras

Existen también algunas especies de bacterias que presentan otras características además de las ya mencionadas y que pueden ser detectadas a través de las técnicas específicas de tinción (**tinciones especiales**), como es el caso de la presencia de flagelos, cápsulas, esporas, etc, y que igualmente forman parte de la morfología de las bacterias ⁽²⁶⁾.

2.7 Hongos

Los hongos tienen características diferentes a las bacterias, por ejemplo; poseen pared celular compuesta mayormente de quitina, son organismos mayormente heterótrofos, carecen de clorofila, su modo de nutrición es por absorción, se clasifican como saprófitos (saprobios), parásitos y mutualistas. Además, requieren de un ambiente húmedo para desarrollarse adecuadamente. Su reproducción puede ser sexual o asexual. Su hábitat natural es el suelo, la mayoría son aerobios estrictos y no poseen la maquinaria para realizar fotosíntesis ⁽²⁷⁾.

En cuanto a las condiciones de temperatura, generalmente crecen entre los 0 °C y 55 °C, aunque su temperatura ideal es considerada entre los 20 °C y 30 °C. Aunque de cualquier forma pueden clasificarse en ⁽²⁷⁾:

-Psicrófilos: Se desarrollan entre 0 °C y 20 °C, con una temperatura óptima entre los 15 °C y 17 °C.

-Mesófilos: Se desarrollan entre los 0 °C a 50 °C, con una temperatura óptima entre 15 °C y 40 °C.

-Termófilos: Con un rango de crecimiento entre 20 °C y 50 °C.

Por otra parte, pueden ser unicelulares o pluricelulares. Los hongos pluricelulares poseen una estructura conformada por una malla filamentosa de hifas, agrupadas formando lo que se conoce como micelio, caracterizado conforme su distinción citoplasmática en ⁽²⁷⁾:

-Hifas septadas: Donde sus células son individualizadas, cada una con su núcleo.

-Hifas cenocíticas: Donde sus células son de apariencia polinucleada.

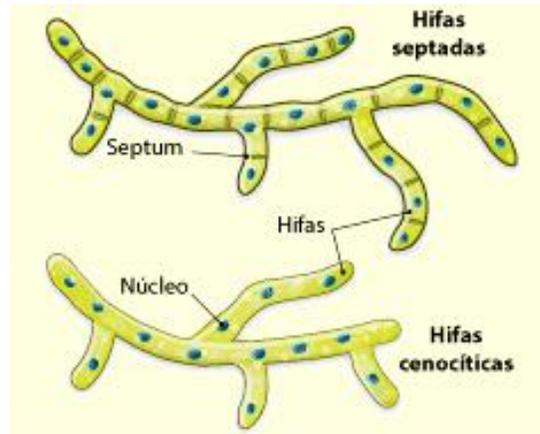
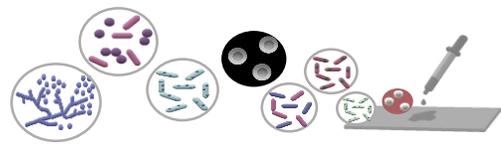


Figura 6. Diferencia entre una hifa cenocítica y una hifa septada ⁽²⁷⁾.

Además de esta clasificación, pueden ser a su vez clasificados dependiendo a su tamaño:

-Macrosifonado: $>1 \mu\text{m}$

-Microsifonado: $<1 \mu\text{m}$

El micelio asume tanto la función vegetativa como la reproductiva. La primera otorga crecimiento y obtención de alimentos y, la segunda la producción de esporas (reproducción sexual), no obstante, pudiendo ocurrir de forma asexual. La respiración de los hongos puede ser aeróbica (en presencia de oxígeno) o anaeróbica facultativa, sobreviviendo en ambientes con baja oxigenación ⁽²⁷⁾.

A continuación, en la figura 7 se muestra la estructura interna de las células fúngicas.

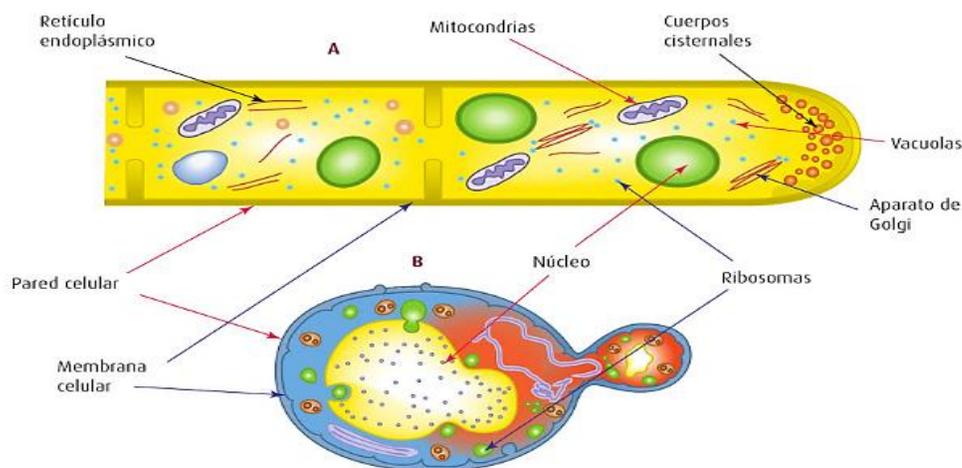
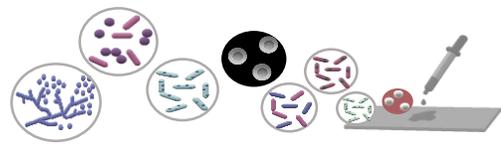


Figura 7. Estructura interna de las células fúngicas ⁽²⁷⁾.



2.7.1 Clasificación

Los hongos son clasificados de forma sistemática en: Zigomicetos, Basidiomicetos, Ascomicetos y Deuteromicetos:

-Ascomycota: La característica básica de los ascomicetos es la presencia de ascos. Un asco es una célula en forma de saco que contiene un número determinado (normalmente 8) de ascosporas. Ejemplo: *Aspergillus*, *Claviceps*, *Neurospora* (28, 29, 30).

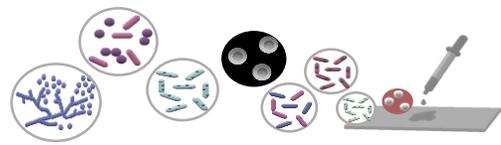
-Basidiomycota: Esta clasificación abarca a los hongos de mayor complejidad morfológica, entre los que se encuentran las conocidas setas, así como los yesqueros, hongos gelatinosos, carbones y royas, entre otros. Este tipo de hongos producen esporas sexuales sobre células con aspecto de bastón, denominadas basidios. Su función dentro de la naturaleza es esencial, sobre todo los descomponedores (28, 29, 30).

-Zygomycota: Estos hongos se encuentran por lo general en el queso, pan y otros alimentos en descomposición. Están formando cigoto hongos, de ahí el nombre zygomycota. Las esporas se producen en saco, llamado esporangio, el cual es de forma redonda. La pelusa grisácea vista en el pan y la comida en descomposición, es en realidad moho de esporangios maduros. Bajo el microscopio se ven como cabeza de un alfiler. Cuando se rompe el esporangio se abren cientos de esporas se liberan. Ejemplo: *Mucor*, *Rhizopus* (presente en el moho del pan) y *Albugo* (28, 29, 30).

-Deuteromycota: Estos organismos son conocidos como hongos imperfectos porque carecen de la reproducción sexual. Se reproducen por esporas asexuales llamadas conidios. La mayoría de los hongos provoca enfermedades a los seres humanos como la tiña, pie de atleta. Ejemplos son *Alternaria*, *Colletotrichum* y *Trichoderma* (28, 29, 30).

De manera general, la importancia de los hongos, así como de las bacterias radica en distinguir cuáles son de importancia clínica, dentro del grupo de los hongos destacan los dermatofitos, los cuales tienen la capacidad para degradar la queratina de pelo, uñas y plumas y pueden producir infecciones superficiales en mamíferos, incluidos los humanos (hospederos inmunocompetentes), llamadas dermatofitosis. Dentro de estos hongos se reconocen principalmente a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* (31, 32).

Los tres géneros ya mencionados constituyen un total aproximado de 40 especies, de las cuales aproximadamente 12 son patógenos para el humano. Los dermatofitos pueden encontrarse en la naturaleza en estado anamorfo y teleomorfo. Los estados



anamorfos pertenecen al filum Deuteromycota y los estados teleomorfos pertenecientes al filum Ascomycota. Además, las especies de dermatofitos se pueden clasificar de acuerdo a su nicho ecológico en: geofílicos, siendo los dermatofitos que se localizan generalmente en el suelo y raramente ocasionan infecciones a humanos; los zoofílicos, que colonizan a animales y pueden transmitirse ocasionalmente a humanos y, por último, las especies antropofílicas, las cuales son transmitidas de humano a humano ⁽³²⁾.

Las infecciones por dermatofitos tienen prevalencia mundial y son conocidas clínicamente como “tiñas” o “tinea”. Generalmente, estas infecciones reciben su nombre con base en la zona del cuerpo donde se localizan, nombrándose primero la palabra tiña y después nombrándose en latín la zona anatómica involucrada, por ejemplo: tiña de la cabeza o tinea capitis ⁽³²⁾.

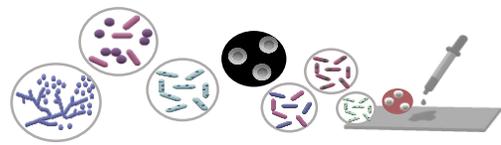
Los síntomas de estas infecciones generalmente están acompañados de escozor y, dependiendo de la zona en que se encuentre la sintomatología puede ser de mayor o menor grado. Algunas formas clínicas son las siguientes: tinea barbae, causando tiña de la barba y el bigote; tinea capitis, causando tiña de piel cabelluda, cejas y pestañas; tinea corporis, causando tiña en piel glabra; tinea cruris, afectando la ingle; tinea manuum, afectando las manos; tinea pedis, generando tiña en pies y, tinea unguium, que afecta las uñas. Es importante saber que varias partes del cuerpo pueden estar infectadas por el mismo dermatofito y los diferentes géneros pueden ocasionar lesiones clínicamente idénticas, por lo cual es necesario reconocer las características principales de cada género y especie ⁽³²⁾.

2.8 Examen microscópico

El examen microscópico nos informa de la presencia o no de microorganismos, de su morfología, de su falta de contraste, de sus características tintoriales, etc. Es el primer paso que nos permitirá orientar el resto del examen, que se completará con el cultivo y aislamiento de las bacterias en los medios adecuados, el examen bioquímico, etc ⁽³³⁾.

2.8.1 Examen de los microorganismos vivos

Este examen hace posible la observación de los microorganismos vivos. Es la llamada observación vital, este tipo de examen se utiliza principalmente para la investigación de los caracteres de movilidad bacteriana, en estudios de morfología (especialmente bacterias en espiral cuya morfología se altera al secarse y teñirse),



agrupación, estructuras bacterianas, la visibilidad de elementos fúngicos con blanco de calcoflúor o mediante el tratamiento con KOH, etc ^(33, 34, 35).

Para este tipo de estudio, se pueden utilizar tanto directamente los productos patológicos como cultivos en medios sólidos o líquidos de los microorganismos. Para ello, es suficiente con la suspensión del microorganismo en un medio líquido consiguiendo su visibilidad al microscopio de campo claro por el distinto índice de refracción entre el medio y el microscopio. Los métodos que se emplean para este tipo de examen son ^(33, 34):

a. Preparaciones húmedas.

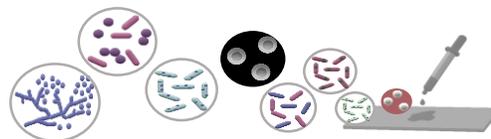
b. Examen en fresco. Consiste en la observación del material a examinar, entre porta y cubreobjetos, sin ningún tipo de coloración ni sustancia clarificante. Este procedimiento tiene mucha utilidad para hongos, protozoarios y helmintos, sin embargo, es muy poco usado en los diagnósticos bacteriológicos, ya que sólo permite identificar la forma de las bacterias y la presencia de movilidad, por tal motivo es que se recurre a los métodos de tinción en el laboratorio, existiendo una amplia variedad de estos. Las preparaciones deben obtenerse de material clínico fresco o de cultivos recientes y realizados en medios adecuados (en caso contrario, es posible que se produzcan modificaciones en la morfología y la movilidad bacteriana).

Por medio del examen en fresco del exudado vaginal es posible observar la presencia de trichomonas y levaduras, en el varón una uretritis supurada puede estar causada por trichomonas, siendo útil para su diagnóstico el examen en fresco del exudado en suero fisiológico. Así mismo, el examen en fresco de una pequeña cantidad de heces diluida en solución salina permite la visualización de las formas vegetativas y quísticas de los protozoos, y en su caso los huevos de helminto ⁽³⁶⁾.

Muestras como sedimentos urinarios, esputos o exudados pueden utilizarse directamente, mientras que si el material es demasiado espeso puede diluirse con solución salina estéril o agua destilada. La preparación se observa al microscopio con objetivo de inmersión y con poca intensidad de luz, para facilitar la observación ^(33, 34).

2.8.2 Preparaciones fijadas y coloreadas

Una de las limitaciones de la microscopía de campo claro es el escaso contraste y por ello se pueden utilizar colorantes para teñir las células y aumentar así el contraste facilitando su observación. Este tipo de preparaciones son las más



frecuentes en Microbiología, tanto las obtenidas directamente a partir de muestras clínicas como las obtenidas a partir del desarrollo de cultivos y por ello serán abordadas con mayor detenimiento más adelante ^(2, 33).

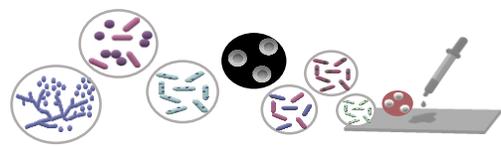
2.9 Colorantes

Los colorantes son compuestos orgánicos y son los reactivos necesarios para las tinciones, que facilitan la observación al microscopio. Cada tipo de colorante tiene afinidad por determinados componentes celulares y generalmente, actúan mediante reacciones de intercambio iónico entre el colorante y los elementos celulares. Muchos de los colorantes utilizados con frecuencia en Microbiología están cargados positivamente (catiónicos) y se combinan fuertemente con constituyentes celulares cargados negativamente (aniónicos), como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos ^(2, 37).

Los numerosos tipos de colorantes utilizados para teñir microorganismos tienen características en común como son: contienen grupos cromóforos, grupos con dobles enlaces conjugados que dan al colorante su color, y pueden unirse a las células por enlaces iónicos, covalentes, o cromóforos ⁽³⁷⁾.

Dos propiedades generales son necesarias antes de que cualquier sustancia sea útil como un colorante: la sustancia debe estar coloreada o lista en la tinción para obtener un producto coloreado, y algunas partes de la tinción deben conservar preferentemente el color mientras que otras partes no lo hacen. Estas dos condiciones se imponen porque el objetivo es aumentar el contraste de color en el sistema de objetos. Este objetivo se logra normalmente mediante una tinción directa del microorganismo, mientras el fondo queda sin colorear. La mayoría de los colorantes se utilizan para teñir directamente la célula u objeto de interés, pero algunos colorantes (p. ej., la tinta china y la nigrosina) se utilizan en tinciones negativas, a veces es conveniente utilizar un proceso de tinción *negativa* o *de fondo* el cual tiñe el fondo y deja los microorganismos inalterados, lo que se tiñe no es la célula y las células no teñidas aparecen como objetos brillantes sobre un fondo oscuro. Además de hacer que todo el microorganismo sea más visible, se han empleado colorantes para ^(37, 38):

1. Mostrar la estructura y detalles más finos de los microorganismos.
2. Revelar la distribución y la naturaleza química de los constituyentes celulares.
3. Determinar el pH y los potenciales de oxidación y reducción.
4. Diferenciar entre organismos.



positivamente (normalmente alguna forma de nitrógeno pentavalente) y se comercializan normalmente como sales de cloruro. Los colorantes básicos se unen a moléculas cargadas negativamente como ácidos nucleicos, muchas proteínas y la superficie de células procariotas. Estos colorantes tiñen estructuras que son ácidas o ligeramente ácidas, es decir, cargadas negativamente. En este grupo de colorantes se encuentran los derivados del trifenil metano como la fucsina básica, cristal violeta o violeta de genciana, así como los derivados de tiacinas como azul de toluidina, azul de metileno o las tioninas ^(37,39).

- c) *Colorantes neutros*: Un colorante neutro se trata de una sal compuesta de un colorante ácido y un colorante básico como por ejemplo, el eosinato azul de metileno que en general posee las propiedades de colorantes ácidos y básicos ⁽³⁹⁾.
- d) *Colorantes indiferentes*: Son colorantes insolubles en agua y solubles en alcohol donde no predomina ni la carga positiva ni la carga negativa, pero tampoco tiene un carácter neutro. En este grupo de colorantes se encuentran los colorantes de los lípidos, como tal Sudán II, Negro Sudán, entre otros ⁽³⁷⁾.

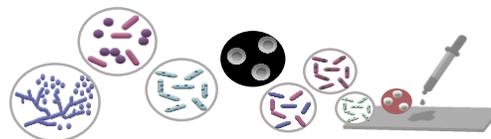
El pH puede modificar la eficacia de tinción de los colorantes ionizables, ya que la naturaleza y la cantidad de cargas en los componentes molares varían con el pH. En consecuencia, los colorantes ácidos tiñen bajo condiciones ácidas en las que las proteínas y muchas otras moléculas presentan una carga positiva, y los colorantes básicos son eficaces a pH más elevados ⁽³⁷⁾.

En Bacteriología, se utilizan preferentemente los colorantes artificiales básicos, debido a la gran basofilia del citoplasma bacteriano, rico en ARN. Los colorantes ácidos se utilizan preferentemente como colorantes de contraste, y los colorantes neutros y los indiferentes para algunas coloraciones particulares ⁽³⁷⁾.

2.10 Mordentes

Con el fin de aumentar la intensidad de la tinción o teñirla por completo, puede ser necesario agregar un reactivo intensificador de tinción. Los mordentes pueden tener una fuerte afinidad por el sustrato como por el colorante y, por lo tanto, puede anclar un colorante a una sustancia. Los mordentes pueden clasificarse como ⁽³⁸⁾:

1. Mordentes básicos que reaccionan con colorantes ácidos.
2. Mordentes ácidos que reaccionan con colorantes básicos.



En presencia de mordentes, los colorantes pueden ser monogénicos que muestran un color, o poligénicos, que dan varios colores con diferentes mordentes. Los mordentes se han usado con éxito con colorantes en todas las posibles secuencias de aplicación, pero variar la secuencia puede afectar los resultados obtenidos. La práctica habitual es aplicar el mordente al sustrato primero y luego el colorante ⁽³⁸⁾.

2.11 La tinción

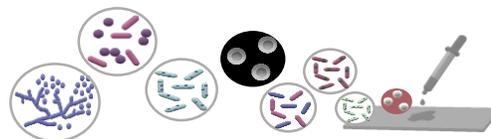
Teñir supone una reacción de intercambio de iones del colorante a lugares activos de la superficie o interior de las estructuras de la célula, esto permitirá contrastar mucho más el microorganismo con respecto al medio que le rodea. Las tinciones pueden ser: simples, diferenciales o selectivas ^(39, 40).

2.11.1 La naturaleza de los procesos de tinción

2.11.1.1 Tinción mediante procesos físicos

Las fuerzas físicas son sin duda, responsables de la unión entre el colorante y el sustrato ya que para este proceso es necesario asumir cambios como los de la solución y la difusión. En algunos de los casos aparentemente simples, los cambios físicos parecen completamente adecuados para explicar el proceso de tinción real. La acción de los colorantes grasos se puede explicar fácilmente en términos de propiedades de solubilidad comunes. Estos colorantes no contienen grupos fuertemente polares y se espera que se disuelvan en materiales no polares ordinarios de los tipos de lípidos y "solubles en lípidos". Cuando el disolvente del colorante y el sustrato no son completamente miscibles, se establecerá un equilibrio de partición que depende de la naturaleza del sustrato y disolvente del colorante. En general, si la similitud en la polaridad entre el colorante y el sustrato es mayor que entre el colorante y su disolvente, la concentración del colorante será mayor en el sustrato. El agua, además de ser disolvente pobre, puede ser importante para transferir el colorante a través de estructuras externas que contienen agua. Otra posibilidad que involucra una verdadera solución podría ser la formación de soluciones sólidas. Este tipo de sistema depende de la dispersión uniforme a nivel molecular de un sólido en otro. Específicamente, el colorante sólido, y la concentración del colorante dependerá solo de un coeficiente de distribución ⁽³⁸⁾.

Presumiblemente, se requeriría algún mecanismo de fijación para mantener el colorante en posición si son compatibles con tales sistemas sujetos a lavado



después de que se haya aplicado el colorante. En ciertos casos, la tinción podría explicarse por el atrapamiento de cristales de baja solubilidad ⁽³⁸⁾.

Un ejemplo de lo anterior es la coloración de las grasas o lípidos, ya que es una tinción por adsorción; los Sudanés III o IV tiñen las grasas por la facilidad que tienen para disolverse en ellas ⁽⁴¹⁾.

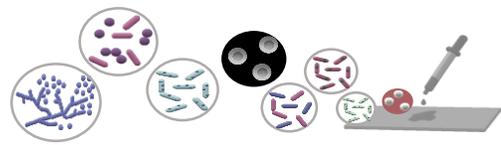
2.11.1.2 Tinción mediante procesos químicos

Tanto la naturaleza del sustrato como el pH influyen en gran medida en la absorción de los colorantes. Los colorantes básicos se absorben más eficazmente en soluciones alcalinas y con menos eficacia en soluciones ácidas. Por el contrario, los colorantes ácidos se absorben con menos fuerza en soluciones alcalinas y con mayor fuerza en soluciones ácidas. Esto indica la necesidad de conocer y controlar el pH en la tinción ⁽³⁸⁾.

Por supuesto, a medida que aumenta la alcalinidad de una solución de colorante básico y la acidez de una solución de colorante ácido, no siempre habrá un aumento indefinido en la absorción del colorante. Por una parte, hay que recordar que bajo extremos de pH se formará una cantidad creciente del color del colorante ya sea básico o ácido. Si estas estructuras son inestables o insolubles, como lo son muchas de ellas, la resistencia de la solución del colorante disminuirá y la intensidad de la tinción se perderá. Además, los aniones (fuertemente adsorbidos) aumentan y los cationes (fuertemente adsorbidos) disminuyen la cantidad captada de un colorante básico por un sustrato. La captación de colorante ácido es favorecida por cationes fuertemente y disminuye por aniones fuertemente adsorbidos. De estos hechos, el mecanismo de tinción parece depender en parte de la ionización del colorante ⁽³⁸⁾.

Ya sea que las fuerzas involucradas sean de naturaleza física o química, las posibilidades más destacadas son estas ⁽³⁸⁾:

- a) El colorante se adsorbe y mantiene en la superficie del sustrato mediante fuerzas de Van der Waals, los dipolos inducidos o enlaces de hidrógeno.
- b) El colorante se mantiene mediante la atracción Coulombica de los iones del colorante a una superficie de carga opuesta. Las superficies cargadas de los sustratos atraen preferentemente iones de carga opuesta, y se forma una capa delgada de concentración relativamente alta.
- c) El colorante forma un enlace salino con iones de sustrato de carga opuesta. Cualquier producto químico de este tipo debe ser insoluble para resistir el lavado.



- d) El colorante reacciona con el sustrato para formar un compuesto covalente nuevo e insoluble.

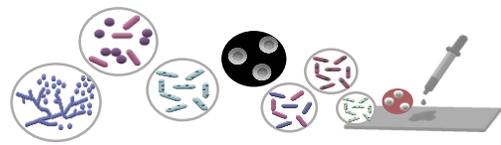
Un ejemplo de lo anterior descrito, es el hecho de la casi imposibilidad de separar completamente el colorante de los componentes en donde ejerció su acción de tinción aun empleando sus líquidos solventes ⁽⁴¹⁾.

2.11.1.3 Base química de la tinción

Los montajes húmedos simples, que consisten en una gota de solución salina, permiten la determinación de la morfología celular y la motilidad. Sin embargo, el material celular y los organismos generalmente son transparentes y se distinguen mejor por el uso de tintes o colorantes biológicos. Antonie van Leeuwenhoek fue el primero en intentar la diferenciación de bacterias con el uso de agentes coloreados naturales como jugo de remolacha en 1719 ⁽¹³⁾.

La metacromasia es un cambio de color característico que se manifiesta por los colorantes naturales (colorantes de anilina o de producción natural) cuando se unen a ciertas sustancias en el tejido o en una solución acuosa. Con la excepción de la hematoxilina, los colorantes naturales han sido reemplazados por colorantes artificiales ⁽¹³⁾.

Los grupos químicos, el cromóforo y auxocromo, completan el componente del colorante. Los grupos cromóforos son los grupos de átomos dentro de una molécula de colorante responsable de su color. El benceno, un compuesto orgánico aromático, experimenta reacciones de sustitución con radicales para formar nuevos compuestos que constituyen el sistema de resonancia del colorante. Algunos de los cambios moleculares resultan en la molécula responsable de su color. Cuanto mayor sea el número de cromóforos en un compuesto, más profundo será el color del compuesto. El benceno más que un grupo cromóforo es un cromógeno. A pesar de que el cromógeno es coloreado y típicamente iónico, no tienen una gran afinidad por las bacterias o los tejidos, y el lavado o un proceso de retención mecánica removerá fácilmente el compuesto. Por lo tanto, este grupo no constituye en sí mismo un colorante. La molécula también debe poseer un grupo ionizante llamado auxocromo, que permite que la molécula del colorante como unidad tenga afinidad. El grupo auxocromo le otorga al compuesto la propiedad de disociación electrostática o la capacidad de formar enlaces salinos con los radicales ionizables en proteínas, glicoproteínas y lipoproteínas en componentes celulares de tejidos u organismos ⁽¹³⁾.



Algunos colorantes tienen más de un auxocromo, incluso en combinaciones con auxócromos básicos y ácidos, la carga negativa predomina normalmente ⁽¹³⁾.

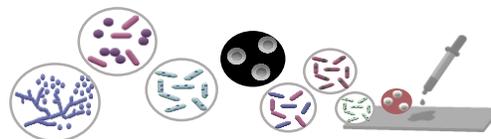
Los colorantes se venden generalmente como sales, por lo tanto, es el grupo auxocromo el que generalmente determina si un colorante se clasifica como catiónico (básico) o aniónico (ácido). La mayoría de los colorantes conservarán la estabilidad de la sustancia y las propiedades catiónicas o aniónicas en todo el pH y, por lo tanto, teñir de manera confiable aquellas estructuras retenidas que están cargadas de manera opuesta ⁽¹³⁾.

2.11.2 Factores que afectan a la tinción

Es muy importante que las técnicas de tinción sean llevadas a cabo adecuadamente, ya que constituyen el primer paso para el estudio microbiológico, dando paso a otras pruebas más ⁽³⁴⁾.

Sin una adecuada tinción no existirá un buen diagnóstico, por lo tanto, se debe tener presente que son muchos los factores que pueden alterar los resultados obtenidos en toda técnica de tinción. Así pues, los principales factores que pueden afectarla son ⁽³⁴⁾:

- a) *Pureza del colorante*: Habrá mayor error y menor calidad en la tinción cuando exista mayor grado de impurezas.
- b) *Concentración del colorante*: Si existe una mayor o menor concentración de la requerida existirá error en la tinción.
- c) *El pH del colorante*: Todos los factores son importantes, sin embargo, este es el más destacado, pues dependiendo del pH del colorante se podrá o no fijar a determinadas estructuras del microorganismo, permitiendo distinguir unos de otros.
- d) *Conservación del colorante*: Deberá mantenerse siempre en un lugar fresco, seco y oscuro, correctamente envasados y etiquetados.
- e) *Elaboración del colorante*: La mayoría ya se encuentran preparados, pero generalmente están a base de soluciones acuosas o hidro-alcohólicas a partir de colorante en polvo que en las cantidades adecuadas permite su solubilidad.
- f) *Técnica empleada*: Se debe ser minucioso al momento de realizar una tinción, en cuanto a seguir adecuadamente los pasos que se marcan y en cuanto a otros aspectos como es el tener un adecuado material de laboratorio, que se encuentre limpio y en las condiciones adecuadas que permitan su uso sin que interfieran en la determinación.



- g) *Temperatura*: Esta variará dependiendo de la tinción que se esté llevando a cabo, aunque la mayoría se lleva a cabo a temperatura ambiente, pero también existen otras en donde es necesario elevar la temperatura para permitir la entrada del colorante a las estructuras.
- h) *Cantidad de muestra*: Esta debe ser representativa y homogénea, es decir, no debe ser ni muy grande ni muy pequeña porque se corre el riesgo de que no se visualice adecuadamente.
- i) *Realizar correctamente la fijación de la preparación de la muestra*: Para la visualización de una muestra esta debe fijarse previamente, generalmente con calor. Esto se realiza con el fin de que los microorganismos queden fijados al portaobjetos para que al momento de adicionar los respectivos colorantes o mordentes no sean arrastrados.
- j) *Soluciones mordentes*: En ocasiones es necesario agregar un reactivo que no presenta capacidad tintorial como tal pero que ayuda a que el colorante respectivo sea fijado a la estructura del microorganismo.
- k) *Tiempos de tinción*: Cada reactivo que sea agregado, ya sea colorante, mordente, etc., requiere de un tiempo distinto dependiendo la tinción, por lo que deben seguirse correctamente, pudiendo ir desde algunos segundos hasta varios minutos.
- l) *Calidad del colorante*: Para asegurarse de tener una adecuada calidad del colorante y por lo tanto de la técnica de tinción a realizar, deben considerarse algunos de los puntos anteriormente descritos, entre los que se incluyen la pureza del colorante, es decir, que esté libre de artefactos o cristales insolubles, de una adecuada concentración y de un correcto pH (el cual variará dependiendo del colorante del cual se trate). Por lo tanto, es importante que antes de comenzar cualquier procedimiento dentro del laboratorio se verifique el buen estado de los colorantes a emplear ⁽³⁹⁾.

Además de lo anterior, debe tomarse en cuenta que los lotes de colorantes a preparar dependerán de la demanda que se tenga dentro del laboratorio, es decir, no se deben preparar lotes demasiado grandes si el uso de los colorantes dentro del laboratorio es mínimo, debido a que con el paso del tiempo dichos colorantes tienden a precipitarse y ya no tendrán la misma calidad ⁽⁴²⁾.

La concentración de las soluciones de tinción puede verse afectadas debido al efecto de la evaporación de los disolventes, afectado así los resultados de las tinciones. Por lo anterior, las tinciones deben verificarse diariamente con cepas de control de calidad que presenten resultados positivos y negativos para cada tinción, con el propósito de garantizar que los reactivos están activos y en buen estado, además de que ofrecen los resultados esperados. Por ejemplo, para el control de la



tinción de Gram se recomienda el uso de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ATCC ⁽⁴³⁾.

Todos los resultados de control de calidad que se realicen deben ser registrados. Además, las tinciones también se deben analizar en búsqueda de precipitaciones o formación de cristales, de ser así es recomendable la filtración de los colorantes ⁽⁴³⁾.

2.11.3 Principales ventajas de las tinciones

Con respecto a la visualización de los microorganismos vivos sin teñir, las técnicas de tinción poseen múltiples ventajas, entre las que destacan ⁽⁴⁴⁾:

- a. Proporcionar el contraste adecuado y suficiente en cada caso, lo que permitirá diferenciar distintos tipos morfológicos.
- b. Observar más adecuadamente la morfología de los microorganismos.
- c. Aportar información complementaria acerca de las estructuras internas y/o externas, mismas que no podrían ser observadas por examen en fresco.
- d. Conocer las características tintoriales para poderla incluir en alguna clasificación.

2.11.4 Realización de la tinción

Para obtener una buena tinción, independientemente de cuál se esté realizando, es necesario seguir adecuadamente una serie de pasos:

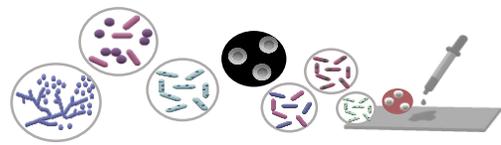
2.11.4.1 Preparación de muestras

Aunque los microorganismos vivos se pueden examinar directamente con un microscopio óptico, a menudo se tienen que fijar y teñir para facilitar su observación, acentuar características morfológicas específicas, y conservarlos para estudios futuros ⁽³⁷⁾.

2.11.4.1.1 Extensión de la muestra

Puede prepararse a partir de productos líquidos o sólidos ^(33, 40):

-Producto sólido: Para la preparación del extendido en el caso de microorganismos procedentes de cultivos sólidos, puede emplearse un asa estéril o la propia asa bacteriológica para transferir una pequeña cantidad del cultivo a la superficie del portaobjetos. También puede prepararse una suspensión del material en una gota



de agua o solución salina colocada previamente en el portaobjetos, extendiéndola con ayuda del asa.

-Producto líquido: En el caso de microorganismos procedentes de cultivos líquidos, puede depositarse directamente con pipeta una microgota del medio líquido o introducir cuidadosamente el asa de siembra en el medio líquido y depositar en el portaobjetos el líquido que queda adherido.

2.11.4.1.2 Secado

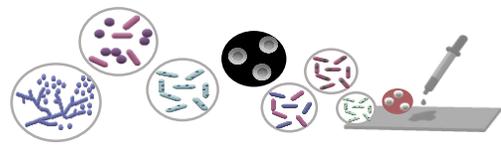
Se dejará secar el extendido al aire a temperatura ambiente, hasta comprobar, por el cambio de aspecto de la preparación, que ésta se ha secado ⁽³³⁾.

2.11.4.1.3 Fijación

Las células teñidas que se observan con un microscopio deben parecerse lo más posible a las células vivas. Dicho lo anterior, la fijación es el proceso por el cual se conservan y fijan en su posición las estructuras internas y externas de las células de los microorganismos. La fijación tiene como objeto la inmovilización de las estructuras del material a estudiar en un estado lo más próximo posible al estado vivo y esta consiste en una muerte rápida de los microorganismos, debida a la coagulación de albúminas protoplasmáticas. En general, provoca un despliegue de proteínas globulares con un aumento en la exposición de grupos reactivos (principalmente carboxilo, amino, sulfhidriilo). Por lo tanto, el material fijo puede exhibir tanto una mayor capacidad de tinción como un aumento de la actividad reductora, además se puede usar para cambiar la afinidad por los colorantes. Durante la fijación se inactivan enzimas que podrían alterar la morfología celular y endurece las estructuras celulares, de manera que no cambian durante la tinción ni la observación. Además de todo lo anteriormente mencionado es una medida de seguridad útil y necesaria ya que las bacterias vivas son generalmente impermeables a muchos de los colorantes utilizados ^(33, 37, 40,45).

Existe un gran número de fijadores, tanto en forma simple (etanol, ácido pícrico) como en forma de mezclas fijadoras. Las formas más habituales de fijación son ^(33, 37, 40,45):

- a.) *Calor*: La fijación por calor preserva la morfología global pero no las estructuras intracelulares. Se pasará, varias veces, la parte inferior de la preparación por la llama azul de un mechero Bunsen hasta que se note caliente al colocarlo en el dorso de la mano, pero sin que queme.
- b.) *Química*: La fijación química se utiliza para proteger subestructuras celulares finas y la morfología de microorganismos más grandes, pero más delicados.



Los indicadores químicos penetran en las células y reaccionan con los componentes celulares, normalmente proteínas y lípidos, para inactivarlos, solubilizarlos e inmovilizarlos. Se cubre la preparación con etanol o metanol, se deja actuar durante varios minutos, se escurre y deja secar.

Para realizar la fijación de una muestra, debe extenderse una película delgada del material que contiene los microorganismos sobre la superficie del portaobjetos y posteriormente dejarse secar. Si no se realizara la fijación, el colorante podría arrastrar los microorganismos del portaobjetos cuando se realizan los lavados ⁽⁴⁶⁾.

Un buen procedimiento de fijación ^(26,33):

- a) Evitará la contracción y la hinchazón de partes de la célula.
- b) Evita la autólisis.
- c) Protege las sustancias celulares que de otro modo podrían ser solubles en los reactivos de tinción.
- d) Hace que los materiales celulares sean más rígidos, lo cual es especialmente importante cuando se emplean secreciones o muestras biológicas muy líquidas.
- e) Evita la formación de artefactos. Los fijadores se eligen para cumplir con los requisitos de un procedimiento de tinción determinado o para los propósitos particulares de un estudio.

2.11.4.2 Coloración

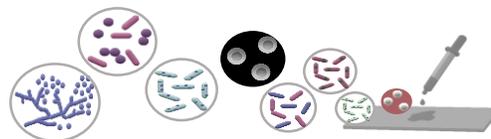
Es el proceso de tinción de los microorganismos. Para teñirlos existe un gran número de productos químicos con propiedades colorantes. Su elección está condicionada al tipo de tinción a realizar. Utilizando generalmente colorantes básicos en soluciones hidro-alcohólicas que teñirán componentes celulares ácidos ^(26, 33).

2.11.4.3 Decoloración

En algunos casos, es necesario después de una coloración, someter la muestra teñida a una decoloración, a fin de diferenciar si dichas bacterias son capaces o no de perder el colorante bajo la acción de situaciones drásticas, lo que permitirá diferenciar distintos grupos bacterianos, sus estructuras o sus características especiales ^(26, 33).

2.11.4.4 Lavado

Es la eliminación del exceso de colorante. Para el lavado se utilizará la piseta, teniendo la precaución de no dirigir el chorro de agua directamente al frotis. Siempre



entre paso y paso, en una tinción, se debe eliminar el exceso de producto ya sea colorante, mordente o decolorante, para evitar interferencias entre un producto y otro que podrían inducir a error ^(26, 33). Otra opción para realizar los lavados sin la utilización de la piseta, consiste en colocar directamente el frotis en posición vertical sobre un chorro medio de agua de la llave durante algunos segundos hasta que ya no se observe el colorante en el chorro que cae al desagüe.

2.11.4.5 Coloración de contraste

Consiste en la utilización de colorantes generalmente básicos que teñirán al final aquellas estructuras que han sido decoloradas y, que por lo tanto, no han podido ser teñidas con el colorante inicial ^(26, 33).

2.11.4.6 Observación al microscopio

Siempre se empezará por el objetivo de poco aumento para comprobar que la muestra está adecuadamente distribuida y no existen otros elementos, como por ejemplo artefactos, restos de colorantes cristalizados, partículas de polvo, etc. Posteriormente se utilizarán objetivos de mayor aumento ^(26, 33).

2.12 Bioseguridad y manejo de Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos

Las normas de bioseguridad para el laboratorio son reglas básicas de comportamiento destinadas a prevenir factores de riesgo laborales procedentes de agentes biológicos, físicos o químicos. El personal de los laboratorios debe incorporar estas normas en todos los procesos que se realicen en el laboratorio que lo pongan en contacto con algún tipo de reactivo, microorganismo o sustancia que pueda ser nocivo para la salud ⁽⁴⁷⁾.

Los principios de bioseguridad son universales: aplican a todo el personal del laboratorio. Implican la utilización de barreras físicas que se interpongan al contacto directo con materiales potencialmente nocivos a la salud, mediante el empleo de guantes, cubrebocas, lentes de seguridad, mascarillas de plástico, etc. Comprenden el conjunto de dispositivos y procedimientos para la eliminación segura de material químico tóxico y material biológico contaminante ⁽⁴⁷⁾.

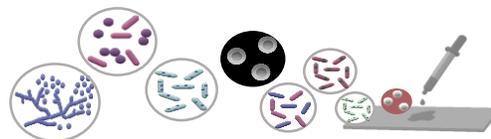


2.12.1 Normas generales de bioseguridad en el laboratorio ⁽⁴⁷⁾

1. Reconocer que la salud del personal es lo más importante.
2. Limpiar y desinfectar las superficies de trabajo al iniciar y finalizar la jornada de trabajo.
3. Está prohibido comer, beber, fumar y/o almacenar comida dentro del área de trabajo.
4. Mantener el cabello corto o recogido.
5. No pipetear sustancia alguna con la boca. En lugar de ello utilizar peras de plástico o pipetas automáticas.
6. Los tubos que se introduzcan a la centrífuga deben ir tapados; no se debe detener manualmente la centrífuga ni destaparla antes de que cese de girar.
7. Evitar contacto con agujas y elementos corto-punzantes.
8. No permitir la entrada de personas ajenas al laboratorio y/o que no tengan sus implementos de bioseguridad adecuados.
9. Cualquier accidente, por pequeño que sea debe comunicarse al responsable del laboratorio.
10. Todos los desechos biológicos, ya sean líquidos o sólidos, tienen que ser descontaminados por el personal del laboratorio antes de su recolección y eliminación por personal especializado.
11. Todos los desechos químicos tóxicos deben almacenarse en contenedores debidamente etiquetados y mantenidos en un lugar especificado del laboratorio, mientras son removidos del área por personal especializado.

2.12.2 Manejo de Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (RPBI)

En las áreas de generación de los establecimientos generadores, se deberán separar y envasar todos los residuos peligrosos biológico-infecciosos, de acuerdo con sus características físicas y biológicas infecciosas, conforme al siguiente cuadro presente en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Durante el envasado, los residuos peligrosos biológico-infecciosos no deberán mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o peligrosos ⁽⁴⁸⁾.



Tipo de residuos	Estado físico	Envasado	Color
Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
Residuos no analíticos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo

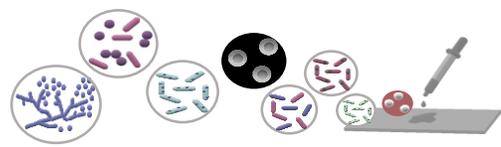
Cuadro 3. Tipos de residuos peligrosos biológicos-infecciosos y su envasado ⁽⁴⁸⁾.

Las bolsas tienen que estar elaboradas de polietileno, en color rojo traslúcido, con un calibre de mínimo 200 y las de color amarillo traslúcido tienen que tener un calibre mínimo de 300, además deben ser impermeables y con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón, libres de cloro. Estas bolsas deben tener marcado el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda "Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos" ⁽⁴⁸⁾.

De igual manera, los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación completa de microorganismos patógenos. Además, tienen que hacerse irreconocibles para su disposición final en los lugares autorizados ⁽⁴⁸⁾.



Figura 8. Símbolo universal de riesgo biológico ⁽⁴⁸⁾.



2.12.3 Aspectos prácticos

a. Utilización del asa bacteriológica

Una flama tiene 3 zonas: una zona azul interior la cual es menos caliente (cono azul claro), una zona amarilla exterior la cual es muy caliente, y una zona intermedia la cual tiene una temperatura de entre las zonas azul y amarilla ⁽⁴⁹⁾.

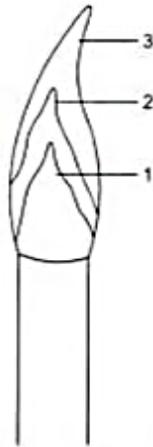


Figura 9. Zonas de la flama-dibujo (1. Menos caliente; 2. Intermedia; 3. Muy caliente) ⁽⁴⁹⁾.

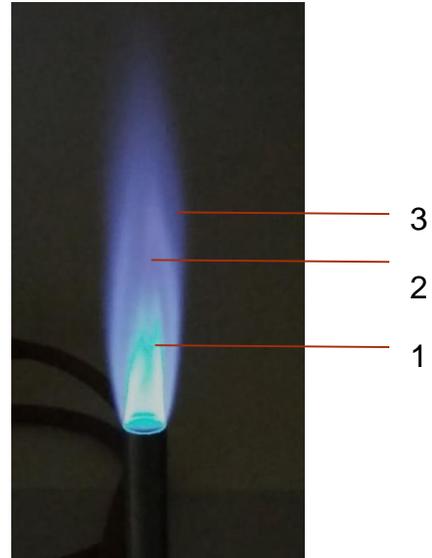
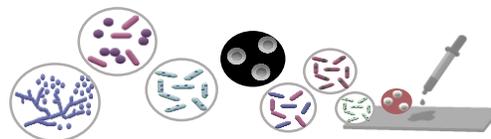


Figura 10. Zonas de la flama (1. Menos caliente; 2. Intermedia; 3. Muy caliente).

Las asas bacteriológicas deben flamearse antes y después de su uso, para evitar contaminar la muestra o contaminarnos con ella. Para ello, se colocan de forma vertical sobre la llama de un mechero, flameándolas en flama intermedia, hasta que se ponga al rojo vivo en toda su longitud, omitiendo el mango. Para evitar las proyecciones de partículas contaminadas, deben ser introducidas en la llama gradualmente y procurar que no estén cargadas de muestra. La zona del mango que entra dentro de los tubos también debe ser flameada. Es por ello que, para evitar algún tipo de accidente deben considerarse en todo momento los aspectos de bioseguridad, en este caso, mantener siempre la bata puesta y cubrebocas, además de lentes de seguridad por si llegara a ocurrir algún tipo de proyección inesperada ⁽³³⁾.

* Fotografía tomada por los autores.



Es importante mencionar que, después de cada flameado, se dejará enfriar el asa antes de un nuevo uso con el fin de evitar la destrucción de los microorganismos ⁽³⁰⁾ o que se quemen las superficies en donde se coloca el asa.

El procedimiento de flameado está diseñado para calentar el extremo del asa gradualmente porque, después de su uso, contendrá cultivo, que puede "disolverse" al calentarse rápidamente con la posibilidad de liberar pequeñas partículas de cultivo y formación de aerosol. El procedimiento se describe a continuación ⁽⁵⁰⁾.

1. Coloque el extremo del mango del asa bacteriológica en el cono azul claro de la llama (esta es la zona menos caliente)
2. Mueva el resto del asa bacteriológica lentamente hacia arriba en la región más caliente de la llama (inmediatamente por encima del cono azul claro).
3. Manténgalo allí hasta que esté al rojo vivo.
4. Asegúrese de que la longitud total del asa bacteriológica reciba un calentamiento adecuado.
5. Deje que se enfríe y use inmediatamente.
6. No coloque el bucle hacia abajo ni lo agite alrededor.
7. Vuelva a esterilizar el asa bacteriológica inmediatamente después de su uso.

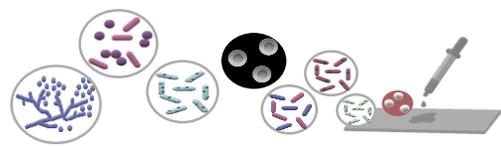
b. Limpieza de los portaobjetos

La limpieza de los portaobjetos es fundamental para obtener buenas preparaciones. Una buena técnica consiste en sumergirlos, al menos 24 horas, en una mezcla de alcohol del 90° (9 partes) y ácido clorhídrico (1 parte). En el momento de su uso, se lavan con agua corriente y se secan con un paño limpio que no deje pelusas. Se considera que un portaobjetos está limpio cuando es "mojable", es decir, cuando se puede extender completamente una gota de agua sobre él ⁽³³⁾.

La limpieza también puede hacerse por inmersión en mezcla sulfocrómica y posterior aclarado en agua destilada. El secado puede hacerse en la estufa, evitando así las pelusas que pueden dejar los trapos ⁽³³⁾.

c. Utilización de la campana de seguridad

Es conveniente que el frotis realizado a partir de material clínico fresco se prepare en la campana de seguridad, ya que la emulsión del material sobre la superficie del portaobjetos con frecuencia origina aerosoles ⁽³³⁾.



2.13 Clasificación y técnicas de tinción

Existen diferentes clasificaciones de las técnicas de tinción, sin embargo, en este trabajo únicamente se abordarán dos; la clasificación de acuerdo a la vitalidad de las células y la clasificación de acuerdo a las estructuras que tiñe, siendo ésta última, la clasificación más empleada en el área de la Microbiología.

Clasificación de las tinciones de acuerdo a la vitalidad de las células

Tinción no vital

Se realiza sobre células muertas ⁽⁴¹⁾.

Tinción vital o inmediata

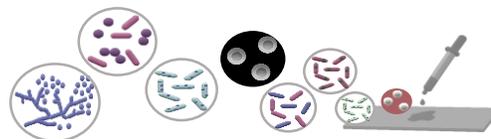
Se practican sobre células vivas. A su vez, ésta puede ser intravital o supravital. Permiten la observación y el estudio de protozoarios, células sanguíneas, células descamadas o disociadas, células en cultivo de tejidos; estructuras muy delgadas y translúcidas como la membrana peritoneal de animales pequeños o epidermis de vegetales, granos de polen etc. En ciertos casos, cuando se requiera destacar alguna estructura celular o tisular se pueden emplear colorantes inocuos para la vida de las células, no modifican la estructura de ellas ni interfieren en sus funciones. A este procedimiento se le conoce como coloración vital ⁽⁴¹⁾.

Tinción intravital

Se practican sobre células vivas, a través de introducir un colorante en la circulación de un organismo vivo, es decir, mediante la administración de colorantes vitales a través de las vías digestiva o intratraqueal; mediante inyecciones sanguíneas, linfáticas, subcutánea, o intraperitoneal. Las soluciones de uso más frecuente son: tinta china, carmín de litio, azul tripan, verde Jano y azul de metileno ⁽⁴¹⁾.

Tinción supravital

Se practican sobre células vivas, pero que están aislados del organismo del cual proceden, es decir, en este procedimiento se emplean colorantes que se aplican a células o tejidos provenientes de organismos vivos. Se demuestran: mitocondrias con el verde de Jano, los gránulos de las células cebadas con el rojo neutro, la sustancia granulofilamentosa de los reticulocitos con el azul brillante de cresyl, ramificaciones nerviosas con el azul de metileno; o el ADN y el ARN de las células con naranja de acridina (empleando el microscopio de fluorescencia) ^(51,52).



Clasificación de las tinciones de acuerdo a las estructuras que tiñe

A continuación, se presenta un cuadro que resumen los diferentes tipos de tinción más frecuentes empleados en Microbiología, con sus características principales:

	Tinción simple	Tinción diferencial	Tinción estructural (especial)
Fijación	Si	Si	Si
Colorantes empleados	Un colorante	Dos colorantes	Al menos un colorante
Observación	Morfología bacteriana	Morfología y otras características	Características estructurales

Cuadro 4. Características de los tipos de tinciones ⁽³⁹⁾.

2.13.1 Tinciones simples

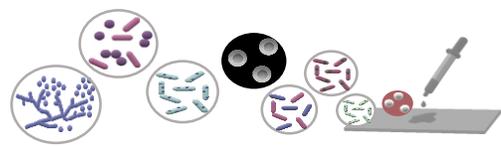
Las tinciones simples utilizan un solo colorante, por lo que en este tipo de tinción toda la muestra se tiñe del mismo color y permiten conocer la morfología y tipo de agrupación bacteriana, como es el caso de la tinción de Loeffler en donde se emplea azul de metileno como único colorante. Se basan en el hecho de que las células tienen una composición química diferente a la de su entorno, de modo que ambos se comportan de forma diferente frente a un colorante ^(37, 38, 40).

2.13.1.1 Tinción de azul de algodón lactofenol

Las tinciones de azul de algodón lactofenol son muy útiles para el área de la Micología, ya que nos permite determinar las estructuras con mejor claridad al observarlas al microscopio ⁽⁵³⁾.

- *Microsporium canis*

Hongo de distribución mundial. Causa de tiña en gatos, perros y monos (llega a alcanzar proporciones epizoóticas). Puede ser también un colonizador del pelaje de los animales pero sin causar sintomatología (ampliamente distribuido entre animales domésticos). Cuando se transmite al ser humano es una especie muy contagiosa que da lugar a brotes epidémicos familiares o escolares. Provoca tinea



capitis y tinea corporis, principalmente en niños. Raramente causa de onicomicosis. En los pacientes con sida las lesiones pueden ser extensas, mientras que puede ser invasor de la dermis en personas en tratamiento inmunosupresor. Produce un ectothrix con células pequeñas y fluorescencia con la lámpara de Wood de escaso valor diagnóstico ⁽⁵⁴⁾.

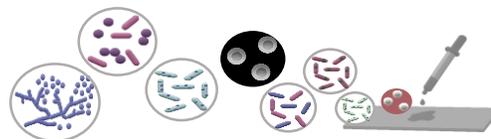
Las especies de *Microsporum* se caracterizan por presentar abundantes macroconidios o macroaleuriconidos de muy diversas formas, como fusiformes, claviformes, ovoides, etc., miden entre 40 a 60 micras de largo por 5 a 15 micras de ancho, con paredes gruesas de 3 a 5 micras; tienen septos o lóculos transversales; generan además escasos microaleuroconidios de aspecto piriforme y en algunas ocasiones pueden estar ausentes, por lo tanto, se requieren de medios especiales de cultivo para favorecer su producción, como el medio papa-zanahoria y arroz ⁽²⁷⁾.

La forma de los macroconidios para *M. canis* es fusiformes (con forma alargada, elipsoide, y con las extremidades más estrechas que el centro), tabicados. Gran cantidad. De 50-100 μm de largo, 10-20 μm de ancho. Además de presentar hifas delgadas, tabicadas, ramificadas que le dan aspecto de "árbol" y abundantes ⁽²⁷⁾.

2.13.1.1.1 Fundamento de la tinción de azul de algodón lactofenol

La tinción de azul algodón de lactofenol no es considerada una tinción diferencial, sin embargo, posee características tintoriales que permiten observar cada uno de los componentes fúngicos y apreciar fácilmente las estructuras para una adecuada identificación. El fenol inactiva las enzimas líticas de la célula e impide que ésta se rompa; de igual forma, destruye la flora acompañante e inactiva a la célula, quitándole el grado de patogenicidad; además, actúa como mordiente cuando se usa en combinación con colorantes. El ácido láctico preserva las estructuras fúngicas al provocar un cambio de gradiente osmótico con relación al interior fúngico, lo que genera una película protectora. El azul de algodón es un colorante ácido, que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, mientras que el glicerol mantiene húmeda la preparación ⁽⁵⁵⁾.

Esta tinción se utiliza en el laboratorio de Micología para la demostración de la mayoría de los hongos miceliales. Es útil para realizar el examen directo de cultivos, ya que es una técnica rápida que permite visualizar perfectamente las estructuras fúngicas. El colorante es fuertemente ácido y se usa para la tinción directa de micelio micólico, el cual toma un delicado color azul claro ^(22, 27).



1 Colorante: Azul de algodón lactofenol

Los componentes del colorante actúan de la siguiente forma:

- Ácido láctico** preserva las estructuras fúngicas
- Fenol** destruye la flora acompañante e inactiva la célula
- Azul de algodón** tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas

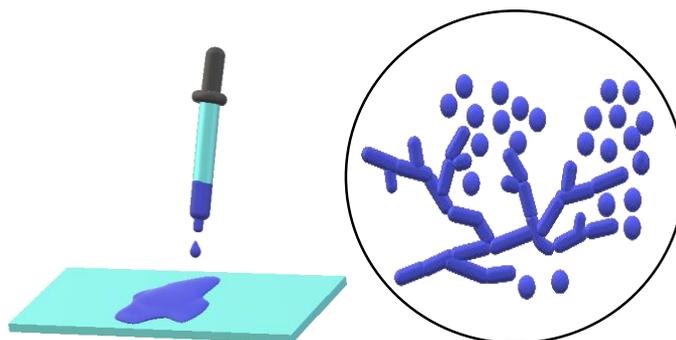


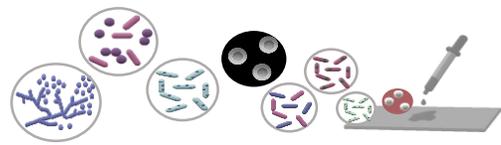
Figura 11. Esquema de la técnica de la tinción de azul de algodón lactofenol **.

Con respecto al procedimiento, a continuación se muestra un cuadro comparativo con lo referido a diferentes autores.

Tinción de azul de algodón lactofenol			
Referencia	Arenas GR	Prats G	UGR
Técnica de tinción	-Luego del crecimiento del hongo en el microcultivo, se retiran el cubreobjetos y el agar. De este modo, los filamentos y los órganos de reproducción quedan unidos al cubreobjetos y al portaobjetos. Ambas partes se montan con azul de algodón.	Tras incubación de unos días, se toma el cubreobjetos que lleva adheridos los filamentos fúngicos y se pone sobre un portaobjetos en el que se ha depositado una gota de azul de algodón lactofenol previamente.	Posterior a la incubación, cuando aparezca un crecimiento visible, puede separarse el cubre suavemente de la superficie del agar. Colocar el cubre sobre una gota de lactofenol en un segundo portaobjetos. Una vez retirado el cubre, se puede retirar también el bloque del agar y hacer con él una segunda preparación con azul de lactofenol.

Cuadro 5. Comparación de técnicas empleadas por diferentes autores para la tinción de azul de algodón ^(56,56,57).

** Esquema realizado por los autores.



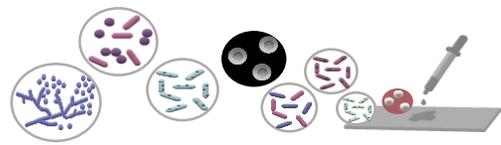
Otros métodos que se pueden realizar para realizar la tinción de azul de algodón lactofenol cuando no se ha realizado un microcultivo consiste en los siguientes ⁽⁵⁶⁾:

- Análisis de un fragmento del cultivo. Consiste en tomar un fragmento de la colonia, dilacerarlo y observarlo con azul de lactofenol. Para observar al microscopio las levaduras, basta tomar una asada del cultivo. En hongos filamentosos, se puede usar una aguja y desmenuzarlos. Es el método habitual, pero puede destruir los aparatos esporíferos y dificultar la identificación.
- Método de la cinta adhesiva transparente (Scotch tape). Es una variante de la técnica anterior y permite observar las estructuras fúngicas casi sin alteración. Se recorta un pequeño cuadrado de cinta y se adhiere a la parte terminal del asa de platino, después se aplica la parte adhesiva con suavidad sobre la colonia y luego se coloca sobre un portaobjetos con una gota de colorante (azul de lactofenol) y se retira el asa, se añade otra gota de colorante, se pone un cubreobjetos y se observa al microscopio.

Es importante mencionar que el cultivo en microcultivo es el más preciso y permite observar las estructuras fúngicas in situ debido a que consiste en obtener un cultivo sobre un portaobjetos y observar el hongo sin deterioro de su morfología ⁽⁵⁶⁾.

2.13.2 Tinciones diferenciales

Las tinciones diferenciales son de las más utilizadas en el área de Microbiología por las amplias aplicaciones que posee para la salud. Este tipo de tinción es cuando se visualiza más de un color porque se utiliza más de un colorante y sirven para poner de manifiesto las características de afinidad por ciertos colorantes de microorganismos. Se basan en el hecho de que distintos tipos de células tienen distinta composición química, y por lo tanto reaccionan de forma diferente frente a una tinción, lo que permite clasificar los microorganismos en diferentes grupos, según su capacidad de tinción ^(30, 37, 38). Una de las tinciones más representativas de este tipo es la tinción de Gram:



2.13.2.1 Tinción de Gram

Esta coloración fue desarrollada, en 1884, por Christian Gram. Por medio de ella, se divide a los microorganismos en 2 grandes grupos, Gram positivos y Gram negativos, según retenga o no el cristal violeta utilizado en la tinción. La tinción Gram puede utilizarse no sólo para bacterias procedentes de colonias aisladas, sino también para el examen directo de muestras clínicas.

Dentro de algunos de los microorganismos que se pueden observar por medio de esta tinción, se encuentran los que a continuación se describirán brevemente con sus respectivas características y los cuales fueron empleados en el libro de: "Las tinciones básicas en el laboratorio de Microbiología: un enfoque gráfico", para alumnos de noveno semestre de la carrera de Q.F.B.

2.13.2.1.1 *Staphylococcus aureus*

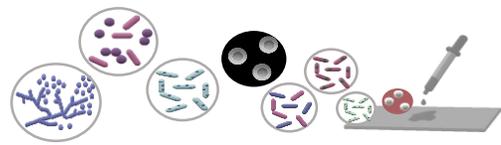
Los estafilococos, son cocos Gram positivos inmóviles, aerobios facultativos que fermentan la glucosa y se distinguen por un crecimiento en racimos irregulares y por unos enlaces cruzados de pentaglicina en su peptidoglucano. La mayoría de las especies son habitantes naturales de la piel y de las mucosas de los mamíferos y no se encuentran en otros hábitats importantes ⁽¹³⁾.

Staphylococcus aureus es la única especie que fermenta el manitol en condiciones de anaerobiosis. Además *S. aureus* tiene una elevada tolerancia a la sal y crece en medios que contienen 7.5 a 10% de NaCl ⁽¹³⁾.

Los estafilococos están entre las más resistentes de todas las bacterias no formadoras de esporas. Permanecen vivos durante meses sobre la superficie de placas de agar selladas, almacenadas a 4 °C y pueden aislarse de muestras de pus desecado de muchas semanas. Algunas cepas son relativamente resistentes al calor (resisten 60 °C durante 30 min) y a la mayoría de los desinfectantes ⁽¹³⁾.

- Morfología

El diámetro de los cocos individuales es de 0.7 a 1.2 µm. Las células en cultivos viejos o las ingeridas por fagocitos pueden ser Gram negativas. El agrupamiento celular en racimos característico de las células es más llamativo en medios sólidos; se produce porque los estafilococos se dividen en tres planos perpendiculares consecutivos y las células hijas no se separan por completo. En medios líquidos es habitual la formación de cadenas cortas; pero al contrario que los estreptococos, los estafilococos rara vez forman cadenas de más de 4 miembros ⁽¹³⁾.



- Patogenia de la enfermedad invasiva

La piel y las fosas nasales de los lactantes se colonizan por *S. aureus* a los pocos días del nacimiento, después, el índice de portadores es baja, para aumentar de nuevo durante la infancia hasta llegar a un índice aproximado del 30% en la edad adulta. Los organismos se encuentran generalmente en la parte anterior de las fosas nasales y en la piel y mucosas; los estafilococos coagulasa negativos prefieren la piel, y los coagulasa positivos, las mucosas. La colonización representa una asociación estable que conlleva una interacción específica entre adhesinas estafilocócicas y receptores celulares. Los organismos que habitan en las fosas nasales son tal vez la principal causa de las infecciones endógenas ⁽¹³⁾.

- Diagnóstico de laboratorio

El hallazgo de cocos Gram positivos en las extensiones teñidas de exudados purulentos proporciona sólo una información sugestiva, ya que los estafilococos no pueden ser diferenciados de otros cocos Gram positivos sólo por datos puramente morfológicos. La identificación de *S. aureus* se sospecha por la morfología colonial, la producción de pigmento, hemólisis, fermentación del manitol y crecimiento de los organismos en un medio con elevada concentración de sal; pero estas propiedades son variables, mientras que una prueba de la coagulasa positiva certifica el diagnóstico ⁽¹³⁾.

2.13.2.1.2 *Streptococcus pyogenes*

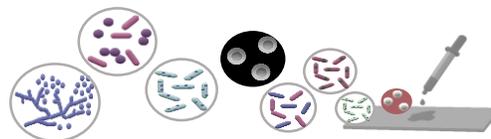
Los miembros del género *Streptococcus*, son cocos Gram positivos, de tamaño relativamente pequeño (1-1.5 μm), anaerobios facultativos, dispuestos en cadenas y pares. Muchas especies de este género son saprófitos para el ser humano, otros son oportunistas y algunos son patógenos. Estos microorganismos fueron descritos en primer lugar por Billroth en 1874, en los exudados purulentos de lesiones de erisipela y de heridas infectadas, con el tiempo denominados estreptococos, se aislaron también de la sangre de enfermos con fiebre puerperal y de la garganta de enfermos con escarlatina. Se sabe que una sola especie de estreptococos puede producir diversas enfermedades ^(13, 26, 58).

- Clasificación

Aunque existen distintas clasificaciones para este género, las más utilizadas consisten en el estudio de ⁽¹³⁾:

- a. Tipo de hemólisis

En 1912, Brown introdujo los términos alfa, beta y gamma para describir los 3 tipos de reacciones hemolíticas que había observado en las placas de agar sangre. Ésta



se basa en la capacidad para romper eritrocitos con la consiguiente producción de hemólisis alrededor de sus colonias en agar sangre.

b. Caracteres antigénicos

Debido fundamentalmente a los esfuerzos de Lancenfield en el inicio de la década de 1930, los estreptococos β -hemolíticos fueron clasificados adicionalmente en varios grupos inmunológicos designados por las letras A a la S.

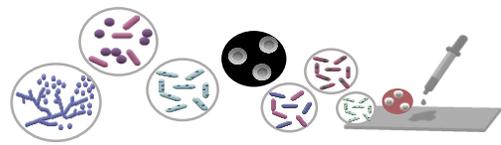
- Patogenicidad

S. pyogenes (*Streptococcus* del grupo A). En general, los estreptococos que pertenecen al grupo A son patógenos en su mayoría y van a corresponder al 90% de las infecciones estreptocócicas. Se pueden encontrar con facilidad en la mucosa nasal y faríngea de las personas enfermas y sanas. Su efecto patógeno es debido a la presencia de enzimas, toxinas y antígenos de superficie. Ocasiona tanto enfermedades supurativas como secuelas no supurativas. El primer grupo incluye la faringitis estreptocócica aguda y todas sus complicaciones purulentas. Además, produce infección uterina posparto (sepsis puerperal), celulitis dérmica, impétigo, linfangitis y erisipela. Las principales enfermedades no supurativas son la glomerulonefritis aguda y la fiebre reumática ^(13, 26, 58).

2.13.2.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

El género *Pseudomonas*, comprende bacilos Gram negativos, generalmente de pequeño tamaño (se tiñen con dificultad en la tinción de Gram), aerobios estrictos, móviles por medio de flagelos dispuestos polarmente. La mayoría de las especies son organismos inofensivos del suelo, pero algunas especies son patógenas para los humanos o los animales. Las especies que son patógenas pueden mostrar alguna adaptación al hábitat humano ^(13, 26, 53).

Pseudomonas aeruginosa se asocia frecuentemente con infecciones de tracto urinario en humanos. Sin embargo, esta especie no es un parásito obligado, ya que también es común en el suelo y por lo tanto parece ser principalmente un patógeno oportunista que inicia infecciones en individuos cuya resistencia es baja. Se puede encontrar en una gran mayoría de ambientes húmedos y, en ocasiones, en la flora normal intestinal o de la piel. Los fregaderos, el equipo de asistencia respiratoria y los humidificadores de los hospitales pueden constituir importantes reservorios. La capacidad de usar moléculas orgánicas simples como fuente de energía y carbono permite la multiplicación de estos organismos en soluciones (tales como antisépticos débiles, suero salino y soluciones jabonosas) que no permitirían el crecimiento de la mayoría de bacterias. Además, los enfermos pueden infectarse sistemáticamente a partir de su propia flora normal ^(13, 26, 53).



A causa de su ubicuidad, *P. aeruginosa* puede encontrarse en muestras clínicas como contaminante sin relación alguna con la enfermedad y es responsable de algunas de las infecciones más graves y mortales en individuos inmunosuprimidos. En los individuos sanos, las infecciones por *P. aeruginosa* son raras y habitualmente leves. Exhibe niveles inusualmente elevados de resistencia a muchos antibióticos; de ahí que la introducción de antibióticos de amplio espectro, que suprimen el resto de la flora, ha traído como consecuencia su aparición como importante patógeno nosocomial ^(13, 26, 53).

2.13.2.1.4 *Escherichia coli*

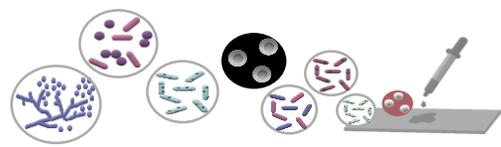
El género *Escherichia*, está constituido por bacterias Gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas, con morfología bacilar, aunque las formas jóvenes son de tipo cocobacilar, móviles. El tubo digestivo de la mayoría de los animales de sangre caliente se coloniza regularmente por *E. coli* a las pocas horas o días del nacimiento, a partir del agua o del alimento ingerido, o directamente desde otros individuos. La mayoría de las cepas de *E. coli* pueden adherirse al moco que recubre la superficie del colon y del intestino delgado distal. Normalmente esta especie es el anaerobio facultativo más común en el colon ⁽¹³⁾.

- Patogenia

Los tres tipos principales de enfermedad, cada uno dependiente de un conjunto específico de determinantes patógenos, son las infecciones del tracto urinario, la meningitis neonatal y las enfermedades intestinales (diarreicas). Estas enfermedades dependen de la combinación de diversas propiedades bacterianas: adherencia a receptores específicos del hospedado, elaboración de exotoxinas específicas y penetración (invasión) de las células del hospedador. Otros factores bacterianos. Aunque no representan un papel tan directo en la patogenia de la enfermedad, contribuyen también a la virulencia de *E. coli* patógeno para producir diversas enfermedades ⁽¹³⁾.

- Infección del tracto urinario

E. coli es responsable de casi el 90% de las infecciones producidas en las vías urinarias anatómicamente normales y sin obstrucción. Las cepas uropatógenas están presentes en las heces, desde donde colonizan de forma secundaria la vagina y la región periuretral. Esta colonización es la primera etapa para el ascenso de las bacterias a la vejiga ⁽¹³⁾.



- Enfermedades intestinales

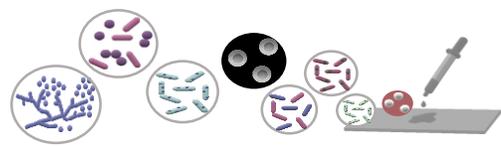
Existen diferentes tipos de enfermedades diarreicas causadas por *E. coli*. Pueden distinguirse cuatro clases de *E. coli* productores de enfermedad diarreica: cepas enterotoxigénicas (ECET), enteropatógenas (ECEP), enteroinvasivas (ECEI) y enterohemorrágicas, enteroadherente difusa (DAEC2). Cada clase manifiesta distintas características patógenas, clínicas y epidemiológicas ^(45,57). Sin embargo, tampoco debe perderse de vista que también *E. coli* se presenta de manera normal como parte de la microbiota ^(13, 58).

2.13.2.1.5 Fundamento de la tinción de Gram

El cristal violeta (violeta de genciana) sirve como colorante primario y se une a la pared celular bacteriana luego de un tratamiento con una solución débil de yodo, que sirve como mordiente para la unión del colorante. Algunas especies de bacterias, debido a la naturaleza química de sus paredes celulares, tienen la capacidad de retener el cristal violeta incluso luego del tratamiento con un decolorante orgánico, como por ejemplo una mezcla en partes iguales de alcohol etílico al 95% y acetona. Las bacterias que retienen el colorante se ven negro azuladas cuando se observan al microscopio, y se denominan entonces Gram positivas. Algunas bacterias pierden la coloración primaria con cristal violeta cuando son tratadas con el decolorante, presumiblemente debido al alto contenido de lípidos de su pared celular. Estas bacterias decoloradas toman el colorante de contraste, la safranina, y se ven rojas cuando se observan al microscopio, denominándose Gram negativas. Cuando estas reacciones de coloración de Gram son observadas junto con el tipo (cocos y bacilos) y la disposición de las células bacterianas, pueden ser usadas para realizar identificaciones presuntivas ^(33,59).

2.13.2.1.6 La reacción de Gram

Hay mucha evidencia que indica que la localización de la reacción de Gram se encuentra en la pared celular. Si los organismos se tiñen con una solución acuosa simple de un colorante básico como la safranina, solo se tiñe el citoplasma. En este caso los organismos teñidos aparecen con espacios incoloros entre ellos, estos espacios son, por supuesto, las paredes celulares no teñidas de los organismos. Los colorantes con los que se cuenta para obtener los mejores resultados en dicha tinción son los colorantes de tetra-, penta- y hexametilparosanilina, así como el metilo de violeta y el cristal violeta. Así mismo, el yodo es por mucho el mejor mordiente, los sustitutos más satisfactorios de ser agentes oxidantes capaces de formar capas con cristal violeta. Al agregar soluciones de yodo a los colorantes



recomendados, las capas de color intenso y de estructura desconocida son altamente insolubles en agua y solo son moderadamente solubles en alcoholes de bajo peso molecular. En la reacción de Gram, el yodo se debe aplicar después del colorante, ya que, si las células se exponen al mordente y luego se aplica el colorante, la decoloración será similar para los organismos Gram negativos y los Gram positivos ^(26, 38, 60).

Las diferencias en la composición de las paredes de las células Gram positivas, que contienen una capa gruesa de peptidoglucano con numerosos enlaces cruzados de ácido teicoico, y las paredes de las células Gram negativas, en las que la capa de peptidoglucano es más delgada, explican las diferencias de tinción de Gram entre estos dos grupos principales de bacterias. Es probable que la gran cantidad de enlaces cruzados de ácido teicoico de los microorganismos Gram positivos contribuya a su capacidad de resistir la decoloración con alcohol. Si bien el colorante de contraste puede ser captado por los microorganismos Gram positivos, su color violeta no se altera ⁽⁶⁰⁾.

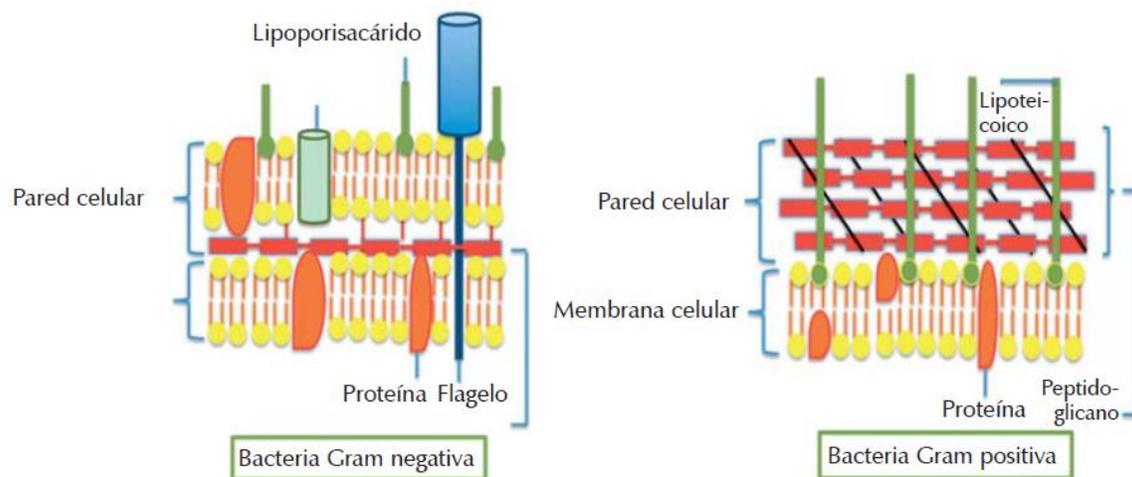
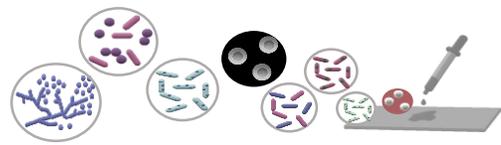


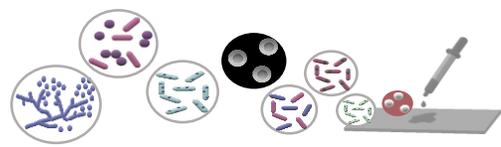
Figura 12. Esquema de las diferencias estructurales entre bacterias Gram negativas y Gram positivas ⁽⁵⁵⁾.



2.13.2.1.7 Mecanismo de la tinción

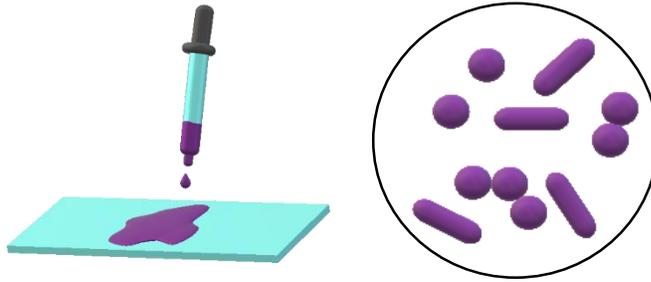
A continuación, se describirá paso a paso la tinción de Gram ⁽³⁸⁾:

1. Aplicación del colorante. El colorante básico se difunde por todo el organismo. La especificidad del colorante primario se basa en la inusual capacidad de las soluciones simples de colorantes trifenilmetanos para teñir la pared celular de los organismos Gram positivos. De igual manera, el carácter Gram negativo de un organismo se basa en la incapacidad relativa de la pared celular para absorber el colorante primario. A valores de pH alcalinos, los organismos Gram positivos retienen más colorante que los organismos Gram negativos. En esta medida e independientemente de cualquier efecto del mordente los organismos Gram positivos son más difíciles de decolorar.
No se recomienda lavar con agua o debe ser mínimo para evitar el lavado del colorante absorbido en la pared celular y el colorante no adherido presente en todo el organismo. Las diferencias en la reacción de Gram estarán relacionadas con la resistencia a la eliminación durante el lavado, por ello la solubilidad en los líquidos de lavado se vuelve importante.
2. Aplicación del mordente. Dondequiera que el yodo penetra y se encuentra con el colorante primario, se forma una capa insoluble en agua. La formación de la capa en la estructura externa podría establecer una barrera de permeabilidad para la penetración adicional del mordente.
3. Aplicación del decolorante. En contraste con los organismos Gram positivos, en un organismo Gram negativo la capa de yodo se lava rápidamente por su solubilidad en un solvente orgánico. La presencia de agua aumenta la decoloración, presumiblemente al aumentar la penetración del solvente orgánico.



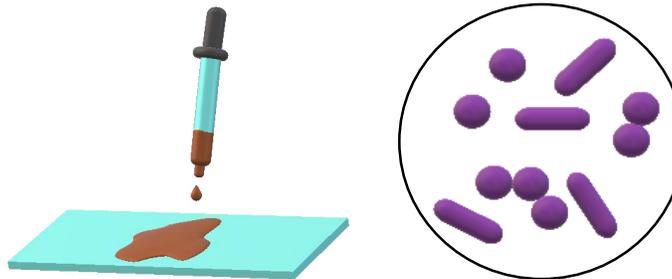
1 Colorante primario: Cristal violeta

Todas las bacterias se tiñen de color azul-violeta.



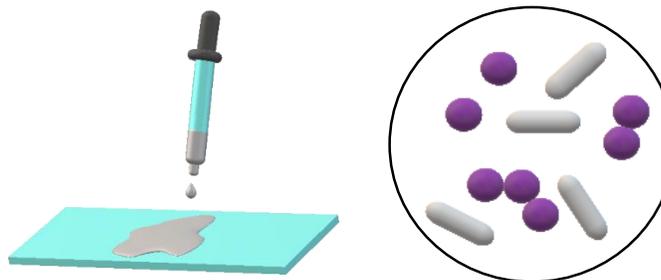
2 Mordente: Lugol

Todas las bacterias permanecen de color azul-violeta.



3 Decolorante: Alcohol acetona

Gram negativas: se decoloran
Gram positivas: permanecen de color azul-violeta.



4 Colorante de contraste: Safranina

Gram negativas: se tiñen de color rojo-rosa
Gram positivas: permanecen de color azul-violeta.

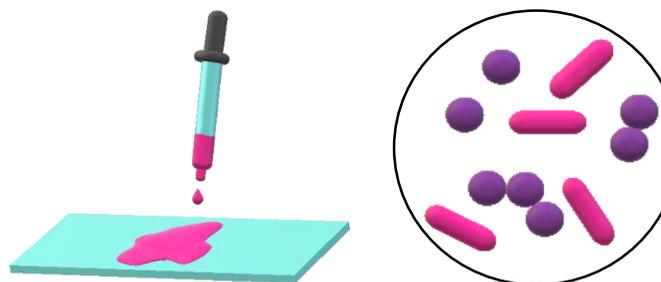


Figura 13. Esquema de la técnica de la tinción de Gram **.

** Esquema realizado por los autores.



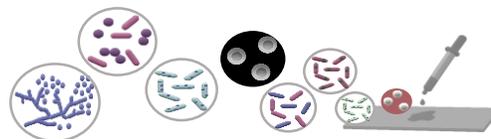
2.13.2.1.8 Variaciones de la reacción

Hay bacterias de un mismo género que pueden observarse en la misma muestra como Gram positivas y como Gram negativas, a este evento se le llama tinción Gram variable secundaria a alteración en nutrientes, temperatura, pH o concentración de electrolitos. No todas las bacterias se pueden teñir por esta técnica, ya que carecen de pared celular (micoplasma) o su pared celular tiene una composición química diferente (micobacterias, que cuentan con una gran cantidad de ácidos micólicos). Las muestras útiles para su uso son líquidos estériles, biopsias para cultivo, abscesos, hisopados, crecimiento de colonias aisladas en medios de cultivo, etc ⁽⁵⁵⁾.

Las variaciones en los resultados de la tinción de Gram pueden tener sus orígenes en problemas técnicos o en cambios en el sustrato biológico de la reacción. El primero puede controlarse en gran medida mediante una estricta atención a los detalles del procedimiento y al comprender las condiciones que afectan el cumplimiento de los objetivos básicos desde cada uno de los pasos de la tinción ⁽³⁸⁾.

Es importante mencionar que el paso más crítico en la tinción es la decoloración. También puede variar de numerosas maneras dependiendo de los cambios en el sustrato biológico. En muchas especies la reacción de Gram cambia con la edad del cultivo, esto es debido a que la resistencia a la decoloración de los organismos teñidos, disminuye a medida que el cultivo envejece. En la medida en que la pared celular juega un papel crítico, cualquier factor que afecte adversamente la síntesis de esta estructura tenderá producir organismos Gram negativos o Gram positivos ⁽³⁸⁾.

En cuanto al procedimiento a seguir, de manera general es el mismo, sin embargo, existen diferentes autores en los que los tiempos que marcan para cada reactivo varían. Por tal motivo se ha realizado una comparación entre los diferentes tiempos que se manejan, tal como se muestra a continuación.



Tinción de Gram			
Referencia	Harvey RA, Champe PC	Forbes BA, Sahn F, Weissfeld A	Koneman EW, Allen SD, et al.
Solución de cristal violeta	1 min	10 a 30 s	1 min
Solución de yodo	1 min	El doble de tiempo que estuvo el cristal violeta	1 min
Alcohol acetona	5 s o dependiendo de la densidad de la muestra.	10 s, los frotis gruesos requieren más tiempo.	Hasta que no se arrastre más cristal violeta, usualmente 10 s o menos.
Safranina	30 s	30 s	1 min

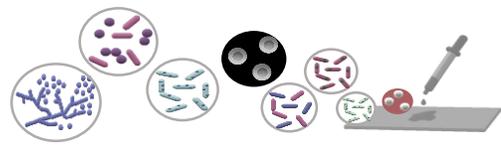
Cuadro 6. Comparación de tiempos empleados para cada reactivo por diferentes autores para la tinción de Gram ^(59, 60, 61).

Con base en las fuentes bibliográficas anteriores y de acuerdo a las características y condiciones del laboratorio que se utiliza para la materia de Bacteriología y Micología Médicas en cuestión de material y reactivos, así como también para fines de este libro, se seleccionaron los mejores tiempos para cada tinción y, en este caso, para la tinción de Gram los tiempos empleados fueron de 10 s para cada reactivo empleado.

2.13.2.2 Tinción de Ziehl Neelsen

La tinción Ziehl Neelsen o de Ácido Alcohol Resistencia ha demostrado ser una de las características más útiles y significativas para separar los bacilos tuberculosos y los organismos relacionados de todos los demás tipos de bacterias. Dichas bacterias son conocidas como resistentes al ácido, un fenómeno descubierto en 1881 por Ziehl y Neelsen ⁽³³⁾.

Las micobacterias son un grupo de pequeños bacilos finos, rectos y a veces curvados, son inmóviles, no forman esporas y se identifican por su propiedad tintorial: son relativamente impermeables a diversos colorantes básicos, pero una vez teñidos retienen el colorante. Resisten de forma específica a la decoloración con disolventes orgánicos acidificados. Esta propiedad, y su crecimiento relativamente lento, son atribuibles a la presencia de una pared celular rica en



lípidos. Las micobacterias varían desde los inocuos habitantes del suelo y del agua, saprófitos y muy difundidos, a los organismos responsables de la tuberculosis y la lepra ⁽³⁶⁾.

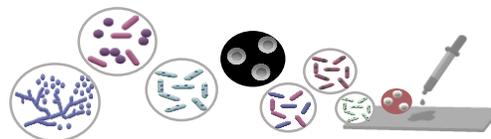
La tinción de Ziehl Neelsen es la técnica comúnmente usada en el diagnóstico rutinario de tuberculosis. Es una técnica rápida, fácil y de bajo costo, lo que permite que se pueda realizar en casi cualquier laboratorio clínico. Esta tinción permite diferenciar a las bacterias en dos grupos: aquellos que son capaces de resistir la decoloración con alcohol-ácido y aquellos que no lo son ⁽⁵⁵⁾.

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. Este género incluye varias especies que son clasificadas en tres grupos de relevancia para animales y humanos: (i) patógenos obligatorios de humanos y animales; (ii) microorganismos que son potencialmente patógenos para los animales y los seres humanos (micobacterias no tuberculosas u oportunistas); y (iii) especies saprofitas, ubicuas o ambientales ^(55,62).

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 ⁽⁵⁵⁾.

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 ⁽⁵⁵⁾.

Por las características que poseen estos microorganismos, es de importancia conocer algunas de las micobacterias más comunes en el ámbito médico y que son de interés para el área de la Microbiología, como es el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, una de las bacterias más representantes a nivel mundial, así como de *Mycobacterium phlei*.



2.13.2.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Es el principal representante de las micobacterias. Se caracterizan por ser bacilos Gram positivos, ácido-alcohol resistentes, con un tamaño de entre 0.2-0.7 x 1-10 micras (μm), ligeramente curvados, aerobios estrictos, inmóviles, no formadores de esporas ni cápsulas y de crecimiento lento ⁽⁶³⁾.

Mycobacterium tuberculosis es el agente causal de la tuberculosis, una de las enfermedades infecciosas más letales en el mundo. En condiciones adversas puede entrar en estado de latencia ⁽⁶³⁾.

2.13.2.2.2 *Mycobacterium phlei*

Varios bacilos ácido-alcohol resistentes encontrados en las plantas, en el suelo y en el agua, se cultivan con más rapidez que los bacilos de la tuberculosis; su papel en la naturaleza concierne principalmente a la degradación de los lípidos. Estos organismos no han sido establecidos como patógenos y algunos de ellos son: *M. phlei* (bacilo de la gramínea *Phleum pratense*) y *M. smegmatis*, ambos organismos se encuentran también en el polvo, el suelo y el agua ⁽¹³⁾.

2.13.2.2.3 Fundamento de la tinción de Ziehl Neelsen

Las micobacterias están cubiertas por un material grueso, ceroso, que resiste la tinción. No obstante, una vez que se tiñen las paredes celulares bacterianas resisten la decoloración por solventes orgánicos fuertes, como el alcohol-ácido, debido al ácido micólico que se encuentra presente. Además, se caracterizan por su posesión única de ciertos tipos de ácidos grasos, alcoholes superiores y carbohidratos. Aunque hay muchos ácidos grasos diferentes en las micobacterias, los ácidos micólicos parecen existir sólo en las paredes celulares de estos organismos, de las nocardias y de las corinebacterias. Los ácidos micólicos no son idénticos, todos son hidroxiácidos de alto peso molecular ópticamente activos que contienen grupos carboxilo (es necesario para la resistencia a los ácidos) y metoxilo. Un arabinogalactano de gran tamaño, unido en forma covalente al peptidoglucano y a unos 30 residuos de ácidos micólicos, forma un puente entre la capa rígida y las capas externas lipofílicas de la pared celular ^(23,33,58).

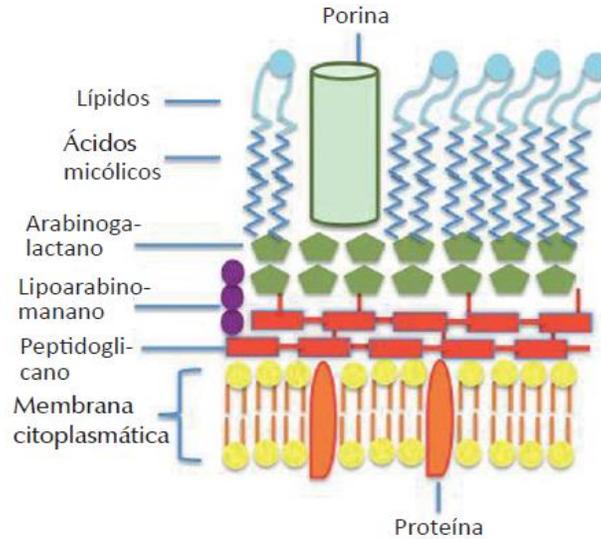
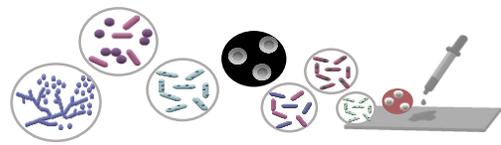


Figura 14. Esquema de la composición de la pared celular de las micobacterias ⁽⁵⁵⁾.

Es importante mencionar que, la ácido alcohol resistencia (AAR) es la capacidad que tiene un material biológico de formar complejos ácido estables con colorantes arilméticos. El mecanismo de la AAR es un fenómeno doble que requiere la penetración de la fucsina al citoplasma bacilar, así como su interacción química con los ácidos micólicos de los péptidos glucolípidos presentes en la pared celular de las micobacterias. Esta reacción impide la salida de la fucsina atrapada en el citoplasma bacilar. Se aseguran así la brillantez y el color rojo intenso de los microorganismos que resisten la decoloración con alcohol y ácidos. La AAR se pierde cuando se remueve la pared externa de las micobacterias con alcohol alcalino ⁽⁶⁴⁾.

Dicho lo anterior, la tinción de Ziehl Neelsen se basa en colocar carbolfucsina, una vez que esta se deposita en la superficie del extendido a teñir, se pasa por debajo del portaobjeto la llama de un mechero y se calienta la preparación ligeramente para solubilizar las ceras, lípidos y otros ácidos grasos de la pared celular para que permita el paso libre del colorante primario (carbolfucsina), el cual tiene una enorme afinidad por los ácidos micólicos presentes en la pared y así forman complejos con el colorante. Al enfriar con agua, los componentes de la pared vuelven a solidificar, resistiendo la acción abrasiva del alcohol ácido, y el azul de metileno que se utiliza como contratinción ^(26, 29, 33, 55,63).

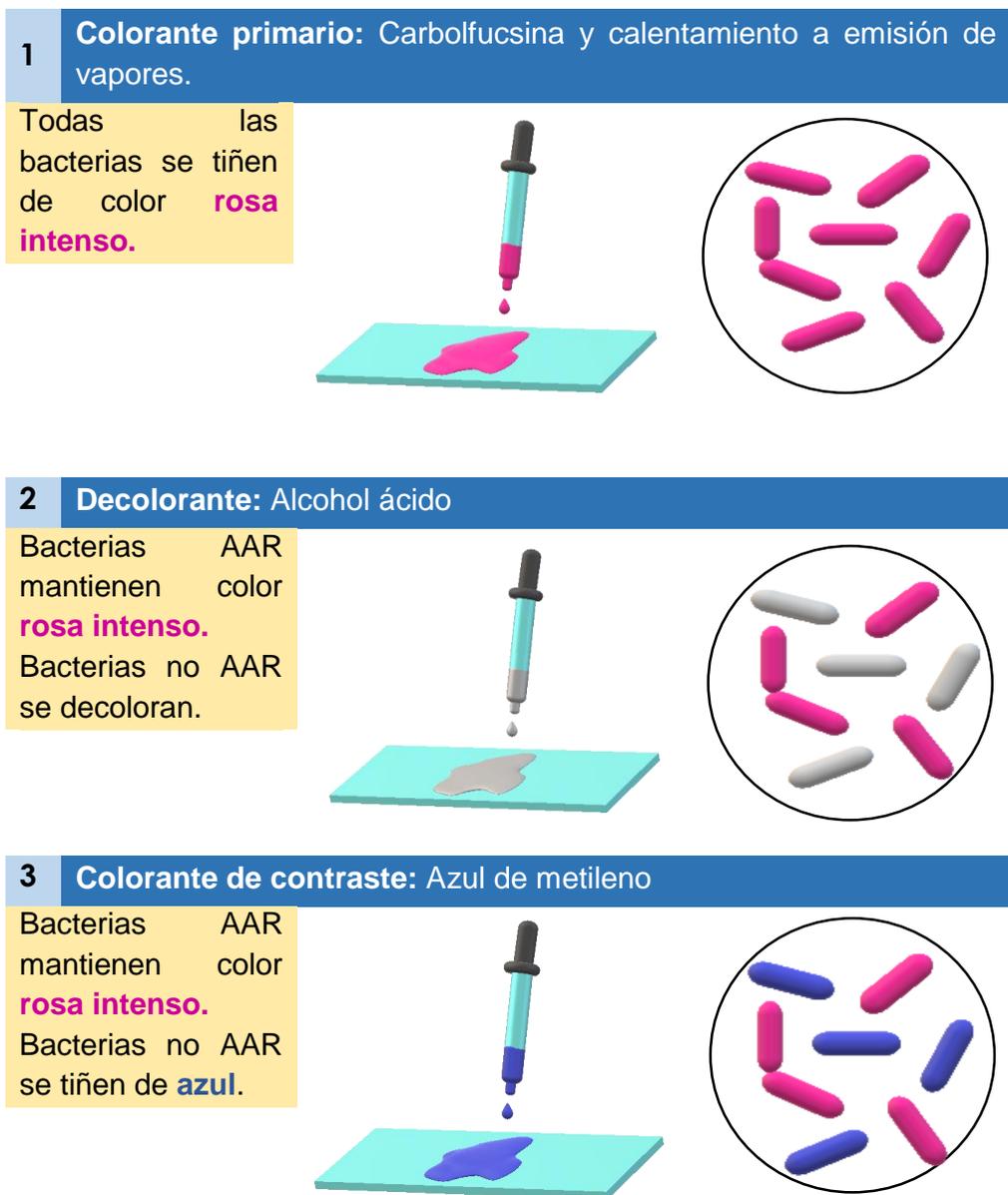
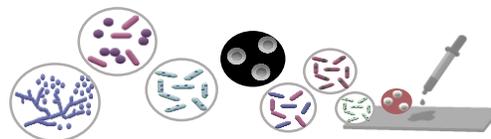


Figura 15. Esquema de la técnica de la tinción de Ziehl Neelsen **.

En cuanto al procedimiento a seguir, de manera general es el mismo, sin embargo, existen diferentes autores en los que los tiempos que marcan para cada reactivo varían. Por tal motivo se ha realizado una comparación entre los diferentes tiempos que se manejan, tal como se muestra a continuación.

** Esquema realizado por los autores.



Tinción de Ziehl Neelsen o ácido-alcohol resistente			
Referencia	Ramos J	-Rodríguez E, Gamboa M, et al. -Brooks GF, Carroll KC, et al.	. Delgado A, Prieto S., et al.
Carbol fucsina	5 min	5 min	5-10 min
Ácido alcohol	Hasta decolorar.	Hasta que solo salga una traza rosa de la preparación o que persista un color rosa débil	Durante 1 min (asegurarse de que no se desprenda más coloración roja)
Azul de metileno	2 min	1 min	1 min

Cuadro 7. Tiempos empleados para cada reactivo por diferentes autores para la tinción ácido resistente ^(33,35,65,66).

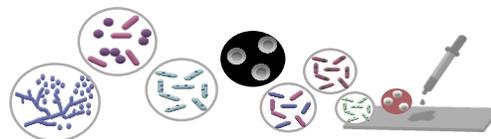
De igual manera, en esta tinción se buscaron los tiempos más adecuados en el laboratorio para cada reactivo empleado en la tinción. En este caso fueron utilizados 5 min para carbolfucsina, 1 min para el ácido alcohol y 30 s para la solución reactivo de azul de metileno.

2.13.2.3 Tinción de Kinyoun

Esta tinción es útil para visualizar quistes de protozoos intestinales que tienen la propiedad de ser ácido-alcohol resistentes y se observa al microscopio con objetivo de inmersión. Los bacilos ácido alcohol resistentes aparecen teñidos de rosa ⁽³³⁾.

2.13.2.2.3 *Rhodococcus equi*

Rhodococcus equi, es un patógeno intracelular facultativo Gram positivo con similitudes con *Mycobacterium tuberculosis*. El patógeno *R. equi* infecta una gran variedad de hospedadores animales, pero se asocia más frecuentemente con la enfermedad bronconeumonial en caballos y está cada vez más aislado de los humanos inmunocomprometidos. El número creciente de infecciones por *R. equi* en humanos se ha observado durante varios años y ahora *R. equi* se considera un patógeno zoonótico emergente. Los casos clínicos en humanos son raros y hasta ahora se han diagnosticado en pacientes inmunocomprometidos. Las fuentes y vías



de infección humana siguen sin estar claras. Se ha sugerido que el contacto con animales de granja o su entorno puede desempeñar un papel en algunos casos de infección, pero la transmisión por alimentos parece ser la ruta más probable, especialmente la exposición por el consumo de carne cruda, poco cocida o contaminada ⁽⁶⁷⁾. También se ha sugerido que la transmisión de la infección en potros se produce por inhalación de polvo contaminado o partículas del suelo. *R. equi* representa una gran amenaza para la salud de los potros en todo el mundo y tiene un impacto económico significativo en la industria de la cría de caballos ⁽⁶⁸⁾.

La incidencia de rodococosis humana ha aumentado a nivel mundial, y la enfermedad representará un problema de salud emergente en los próximos años. La patogenicidad de *R. equi* se ha atribuido a la presencia de proteínas asociadas a la virulencia codificadas por plásmidos (Vap), que aparentemente son esenciales para la supervivencia del patógeno dentro de las células fagocíticas ⁽⁶²⁾.

Rhodococcus equi es ubicuo en el suelo y tiene una distribución mundial; su capacidad para invadir el macrófago y prevenir la fusión del fagosoma lisosoma crea dificultades en el tratamiento, con la terapia de combinación antimicrobiana a largo plazo necesaria. La naturaleza intracelular de *R. equi* complica el desarrollo de la vacuna, al igual que el sistema inmune inmaduro del potro neonatal. Las vacunas tradicionales han sido ineficaces, aunque actualmente hay algunos avances. Una opción disponible es el uso de plasma hiperinmune equino como un plasma adulto comercial específico para *R. equi*, aunque se discute la efectividad y el mecanismo de acción no está claro. Su diagnóstico clínico es difícil; sin embargo, los métodos tradicionales de cultivo y tinción se utilizan en el aislamiento e identificación del organismo ⁽⁶⁹⁾.

2.13.2.3.1 Fundamento de la tinción de Kinyoun

La modificación de Kinyoun a la técnica de Ziehl Neelsen se denomina "método frío", porque utiliza un detergente tensoactivo como el tergitol, en lugar de tratamiento con calor. Esta coloración permite una tinción más rápida que el clásico procedimiento de Ziehl Neelsen, y evita la necesidad de calentamiento ^(33, 34).

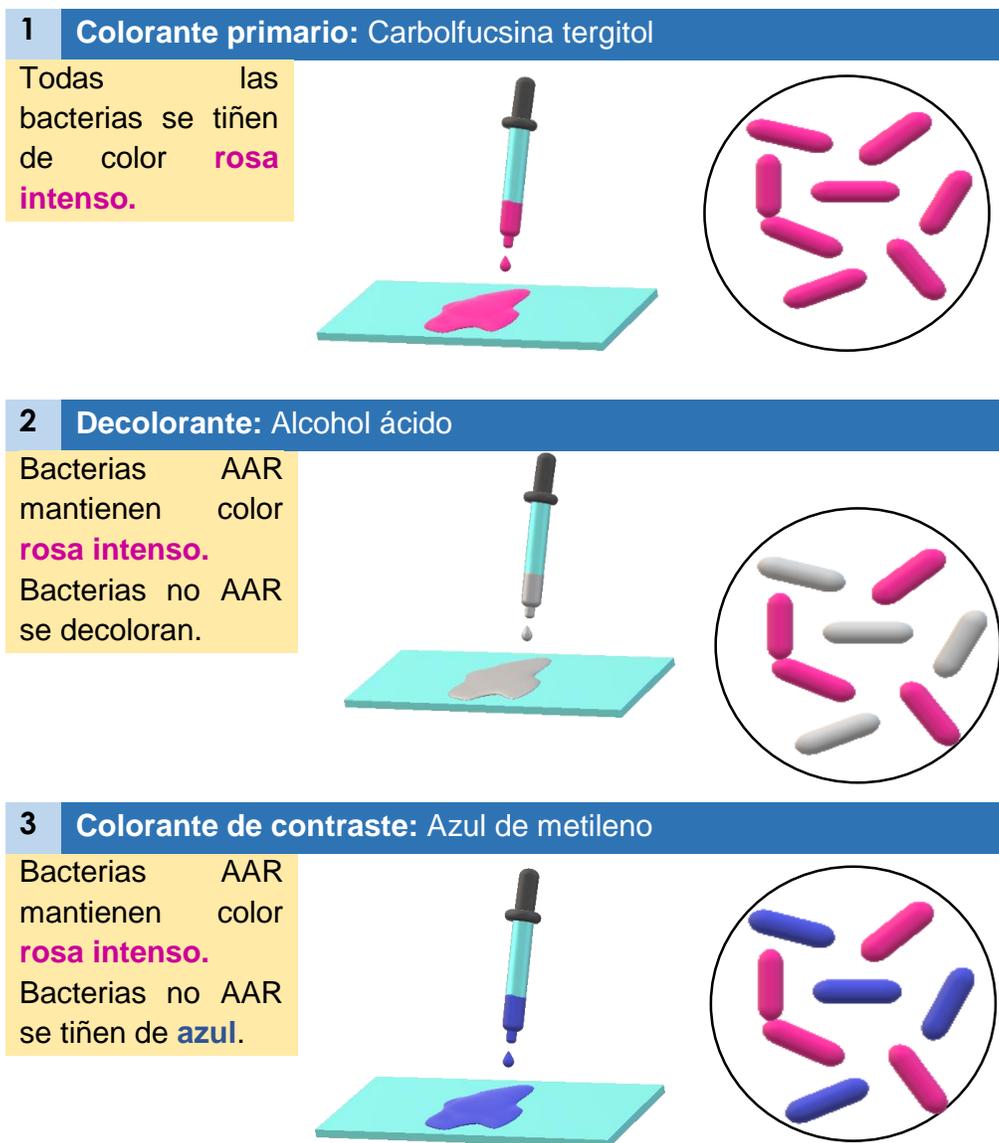
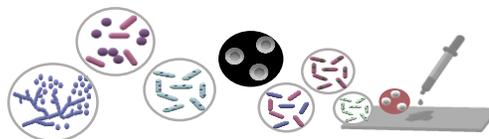


Figura 16. Esquema de la técnica de la tinción de Kinyoun **.

En cuanto al procedimiento a seguir, de manera general es el mismo, sin embargo, existen diferentes autores en los que los tiempos que marcan para cada reactivo varían. Por tal motivo se ha realizado una comparación entre los diferentes tiempos que se manejan, tal como se muestra a continuación.

** Esquema realizado por los autores.



Tinción de Kinyoun			
Referencia	Brooks GF, Carroll KC, et al.	Koneman EW, Allen SD, et al.	Goldman E, Green LH
Fucsina de Kinyoun	3 min	5 min	3-5 min
Ácido alcohol	Decolorar	3 min. o hasta que no aparezca más color rojo.	Hasta que desaparezca el color (cerca de 2 min)
Azul de metileno	1 min	3-4 min	30-60 s

Cuadro 8. Tiempos empleados para cada reactivo por diferentes autores para la tinción de Kinyoun ^(59, 66,70).

En el laboratorio se seleccionaron los mejores tiempos para la tinción, siendo en este caso para la tinción de Kinyoun, 5 min para el reactivo de carbolfucsina tergitol, 1 min para el ácido alcohol y 30 s para azul de metileno.

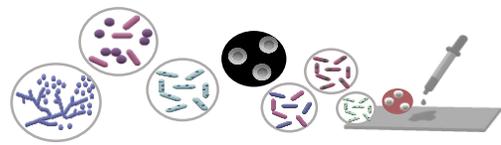
2.13.3 Tinciones especiales

Este tipo de tinciones se emplean para resaltar las características o estructuras específicas de las bacterias, ya sea cápsulas, flagelos, esporas, gránulos metacromáticos, entre otras. Algunas de ellas se describen a continuación:

2.13.3.1 Tinción de cápsula

La cápsula es una capa mucosa, bien organizada, más o menos gruesa, que envuelve la pared celular de algunas bacterias. Está compuesta de polisacáridos, mucopolisacáridos o polipéptidos. A consecuencia de su elevado contenido en agua, se tiñen débilmente por los colorantes, por ello algunas técnicas colorean el fondo de la preparación, destacando sobre él las cápsulas sin teñir ⁽³³⁾.

Debido a que la cápsula bacteriana no se encuentra en todas las células, se le considera como una tinción especial. Dicha cápsula, que se puede encontrar tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas. Por lo tanto, esta tinción se emplea para determinar si un microorganismo posee o no dicha cápsula con el objetivo de identificar a los microorganismos que la poseen, como es el caso de *Klebsiella pneumoniae* y de *Streptococcus pneumoniae* ⁽²⁹⁾.



dependen del efecto antifagocítico de su cápsula: las cepas no capsuladas (R son avirulentas) ⁽¹³⁾.

2.13.3.1.2 *Cryptococcus neoformans*

Este agente es un hongo levaduriforme, encapsulado y de distribución mundial, aislado con frecuencia en las deyecciones de los cerdos, aves y en el suelo. En el ser humano es capaz de producir un cuadro que varía desde la infección asintomática hasta la meningitis o la sepsis. La puerta de entrada es casi siempre la respiratoria tras la inhalación del germen en aerosol, diseminándose desde el pulmón hacia otros sitios ⁽⁷²⁾.

La meningitis/meningoencefalitis criptococócica (MCC) es una forma rara de infección del sistema nervioso, producida por *Cryptococcus neoformans*. Mundialmente, casi 1 millón de personas con virus de inmunodeficiencia humana (VIH) desarrollan la MCC cada año. En dependencia del tratamiento, hasta un 70 % muere en 3 meses. Históricamente, casos humanos de criptococosis en climas templados se atribuyen primariamente al *Cryptococcus neoformans* debido a su distribución a nivel mundial. El estudio del LCR con tinta china es el medio diagnóstico inicial de mayor eficacia ⁽⁷²⁾.

Las características más estudiadas sobre *C. neoformans* son la presencia de la cápsula polisacárida y la producción de melanina. El polisacárido capsular puede: Inhibir la producción de ciertas linfocinas provocando respuestas tanto celular como humoral muy débiles, enlazar e inmovilizar parcialmente a los anticuerpos dirigidos contra la pared celular y la cápsula del hongo y además, enmascarar a los anticuerpos ⁽⁷³⁾.

La reproducción asexual representa el estado anamórfico, el cual está caracterizado por la producción de células levaduriformes gemantes (propágulos asexuales), que típicamente desarrollan una gran cápsula compuesta por polisacáridos. Las levaduras son redondas (4-6 μm de diámetro) o en ocasiones ovaladas. El estado sexual del hongo está caracterizado por la producción de basidiosporas ⁽⁷³⁾.



2.13.3.2 Tinción de tinta china

2.12.3.2.1 Fundamento de la tinción de tinta china

Muchas células bacterianas se rodean con uno u otro tipo de gel hidrófilo. Con frecuencia esta capa es gruesa; comúnmente es más gruesa que el diámetro de la célula ⁽⁵⁷⁾. Esta es una tinción simple con ciertas diferencias, ya que nos permite observar características estructurales de la bacteria además de su morfología. Ésta se caracteriza por permitir visualizar sobre un fondo oscuro la forma de la bacteria además de la presencia de cápsulas ⁽²⁶⁾.

1 Colorante: tinta china

El colorante no tiñe a los microorganismos y la cápsula desplaza a las partículas de carbono coloidal de la tinta china.

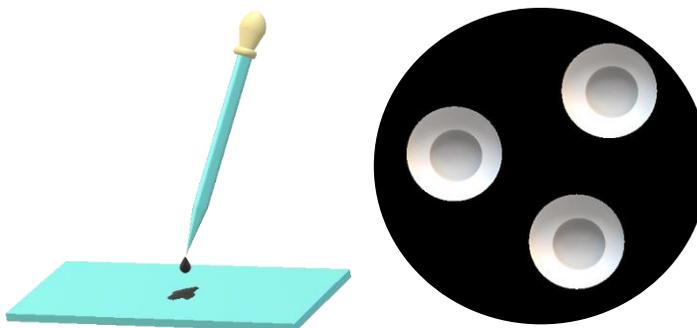
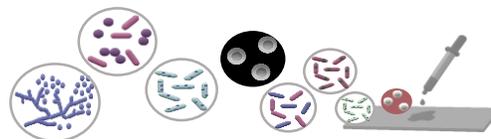


Figura 17. Esquema de la técnica de la tinción de tinta china **.

Para esta tinción, el material en estudio debe ser mezclado con una pequeña gota de tinta china, pura o diluida si fuere necesario de acuerdo a la claridad con que se observe en el microscopio ⁽²²⁾. Observándose la cápsula bajo el microscopio como una región trasparente rodeada de color negro que será el cuerpo del bacilo, debido a que la cápsula no puede ser penetrada por el colorante, pero el cuerpo del bacilo sí.

Con respecto al procedimiento, a continuación se muestra un cuadro comparativo con lo referido a diferentes autores.

** Esquema realizado por los autores.



Tinción de tinta china			
Referencia	Gamazo C, López I, et al.	Rodríguez E, Gamboa M, et al.	Arenas R
Técnica de tinción	Tomar una gota de la muestra, colocarla en el portaobjetos y añadir una gota de tinta china que no supere el tamaño de la gota de muestra y mezclar. Colocar cubreobjetos	En el extremo de la lámina colocar una gotita de muestra y agregar una gotita de tinta china y mezclar con el asa. Extender esa mezcla hasta que forme una película delgada.	Colocar una gota del producto biológico por examinar en un portaobjetos con una gota de tinta china (dilución de 1:2 con agua destilada) y coloque el cubreobjetos.

Cuadro 9. Comparación de técnicas empleadas por diferentes autores para la tinción de tinta china ^(16, 56, 65).

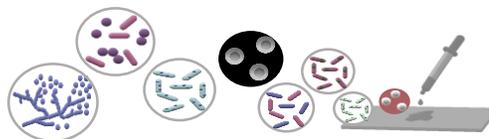
Es necesario mencionar que en otra referencia se encontró que cierta variación en la técnica con respecto a las anteriores mostradas. La muestra de líquido cefalorraquídeo se fijó en una placa con dos gotas de tinta china y 5 minutos después se observó en el microscopio ⁽⁷⁴⁾.

De igual manera, como en las tinciones anteriores, se seleccionaron los mejores procedimientos para llevarlos a cabo en el laboratorio, mediante ensayo y error, por lo cual en esta tinción se seleccionó una dilución con agua 3:4 para la tinta china, empleando tinta china marca "Azor", ya que es la que presentó mejores resultados.

2.13.3.3 Tinción de rojo Congo

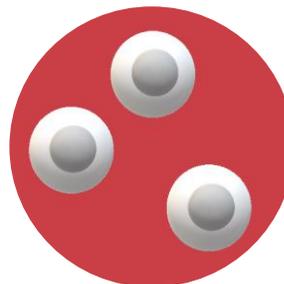
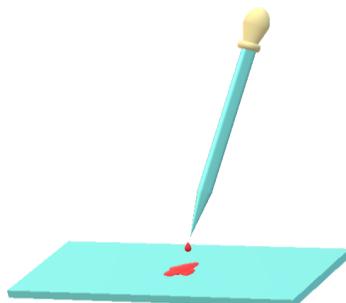
2.13.3.3.1 Fundamento de la tinción de rojo Congo

A diferencia de la tinción de tinta china, en la tinción de rojo Congo se emplean dos reactivos, uno de ellos, el rojo Congo y el segundo es un mordente de cápsula. Dicho colorante penetrará el cuerpo del bacilo sin lograr teñir la cápsula, por lo que se observará en el microscopio como una zona de halo transparente rodeado de color rojo del bacilo.



1 Colorante: Rojo Congo

El colorante no tiñe a los microorganismos y la cápsula desplaza a las partículas del colorante.



2 Mordente: Mordente de cápsula

El colorante se fija con el mordente

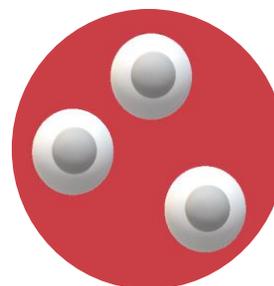
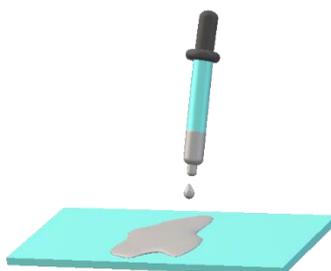


Figura 18. Esquema de la técnica de la tinción de rojo Congo **.

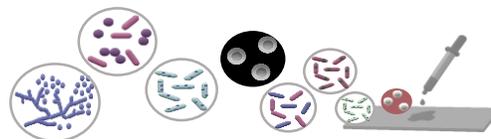
Con respecto al procedimiento, a continuación se muestra un cuadro comparativo con lo referido a diferentes autores.

Tinción de rojo Congo		
Referencia	García A, Zamudio MM	Troya S
Rojo Congo	Una gota y hacer suspensión con la cepa	Una gota y hacer suspensión con la cepa
Fijación	Si	No
Mordente de cápsula	3 min	1 min

Cuadro 10. Tiempos empleados para cada reactivo por diferentes autores para la tinción de rojo Congo ^(75,76).

En el laboratorio se seleccionaron los mejores tiempos para la tinción, en este caso, fueron necesarios 3 min para el mordente de cápsula. La extensión de la cepa fue realizada con el reactivo de rojo Congo.

** Esquema realizado por los autores.



2.13.3.4 Tinción de gránulos metacromáticos

Muchas bacterias, cuando crecen bajo determinadas condiciones de cultivo, son capaces de acumular dentro del citoplasma depósitos de materiales de reserva que se denominan inclusiones. Los gránulos metacromáticos son un ejemplo de estas inclusiones; constituyen acumulaciones de polifosfato y se conocen también como gránulos de volutina o cuerpos de Babés-Ernst ⁽⁷⁷⁾.

La volutina representa una reserva de fosfato inorgánico (polifosfato) que la célula puede utilizar para sintetizar ATP. En general está compuesta por células que crecen en un medio rico en fosfato. Además de las bacterias, las algas, los hongos y los protozoos también poseen gránulos metacromáticos ⁽⁴⁶⁾.

Una de las bacterias que posee las características anteriormente mencionadas y que puede ser identificada por medio de la tinción de gránulos metacromáticos, ya sea por la técnica de Albert o Loeffler (las cuales serán descritas más adelante) es *Corynebacterium xerosis*, por lo cual es importante conocer más sobre ella como se describirá a continuación.

2.13.3.4.1 *Corynebacterium xerosis*

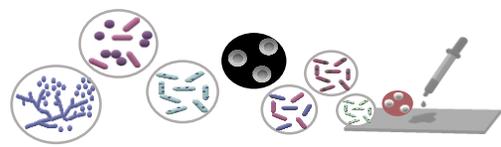
El género *Corynebacterium* está compuesto por un grupo de bacilos Gram positivos inmóviles, presentan un tamaño muy pequeño (1-6 μm), aerobios, no esporulados, que frecuentemente se agrupan en empalizadas originando formas geométricas parecidas a las letras chinas, poseen extremos abultados en forma de maza y se tiñen de forma irregular. Los miembros del género *Corynebacterium* están muy extendidos: algunos son habitantes comunes del suelo, otros son agentes causales de las plantas y otros son organismos que viven con o son patógenos para los seres humanos y animales ^(13, 26, 58).

La especie más importante es *Corynebacterium diphtheriae*, aunque existen otras que también son patógenas para el hombre. *C. xerosis* es una de las especies de este género que fundamentalmente se comportan como oportunistas pueden provocar algún efecto patógeno en un momento dado ^(13, 26, 578).

2.13.3.5 Tinción de Albert

2.13.3.5.1 Fundamento de la tinción

Los gránulos se llaman así porque muestran un efecto metacromático; esto es, aparecen de un color rojo o de diferentes tonos de azul, cuando se tiñen con azul de metileno o azul de toluidina. Son comunes en corinebacterias, espirilos y bacilos



láticos y su presencia se utiliza en la identificación de esas bacterias. Estos gránulos tienen una fuerte afinidad por colorantes básicos como la fucsina básica, el cristal violeta, el azul de metileno o el verde de malaquita. Cuando se tiñen con el colorante de Albert, que contiene verde malaquita, se observan de un color café verdoso oscuro ^(22,23).

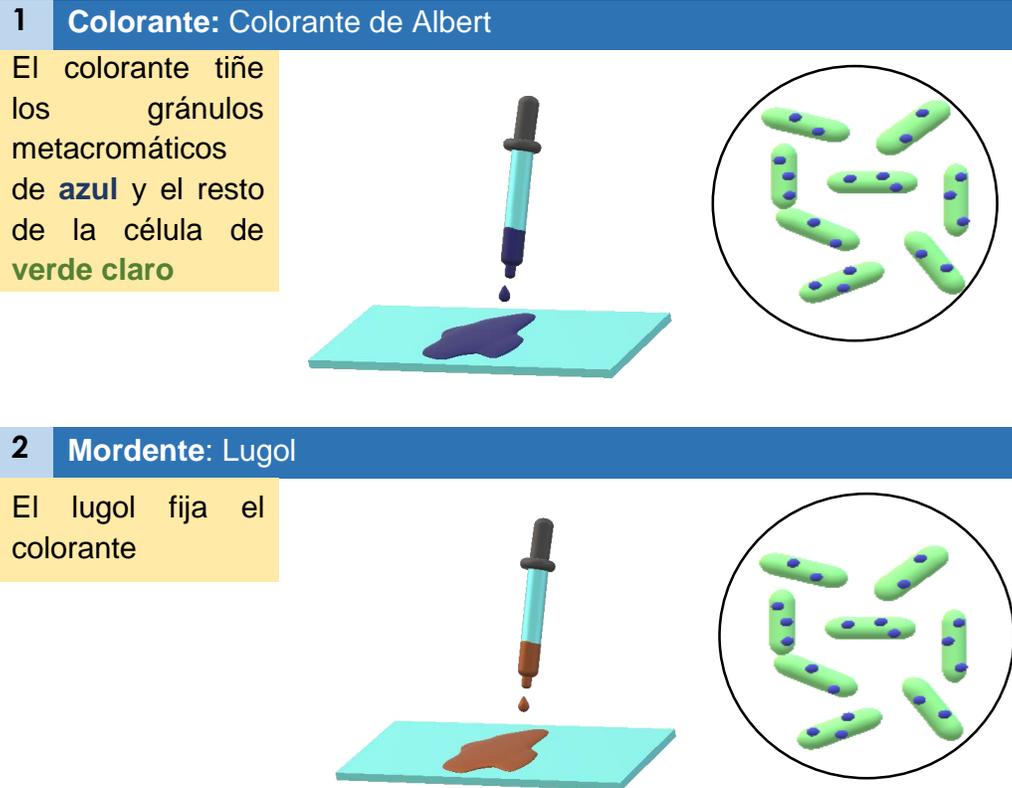
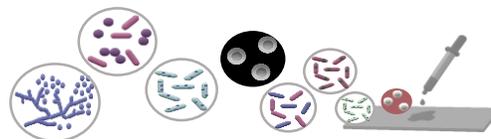


Figura 19. Esquema de la técnica de la tinción de Albert **.

En cuanto al procedimiento a seguir, de manera general es el mismo, sin embargo existen diferentes autores en los que los tiempos que marcan para cada reactivo varían. Por tal motivo se ha realizado una comparación entre los diferentes tiempos que se manejan, tal como se muestra a continuación.

** Esquema realizado por los autores.



Tinción de Albert			
Referencia	Rodríguez E, Gamboa M, et al.	Kumar S	Delgado A, Prieto S, et al.
Colorante de Albert	1 min	3-5 min	15 min
Lugol	5 min	1 min	1 min

Cuadro 11. Tiempos empleados para cada reactivo por diferentes autores para la tinción de Albert ^(33, 65,78).

Anteriormente se mencionó que se seleccionaron los mejores tiempos en el laboratorio para cada reactivo empleado en la tinción. En este caso, para la tinción de Albert, se colocó colorante de Albert por 5 min y lugol por 1 min.

2.13.3.6 Tinción de azul de metileno o de Loeffler

2.13.3.6.1 Fundamento de la tinción de azul de metileno o de Loeffler

Esta tinción también se emplea para la observación de los gránulos metacromáticos en las bacterias, por lo que su fundamento es el mismo que el anterior mencionado, a diferencia de que el colorante que se utiliza es el azul de metileno en lugar del colorante de Albert, por lo que dichos gránulos se observarán de color azul oscuro ⁽⁵⁹⁾.

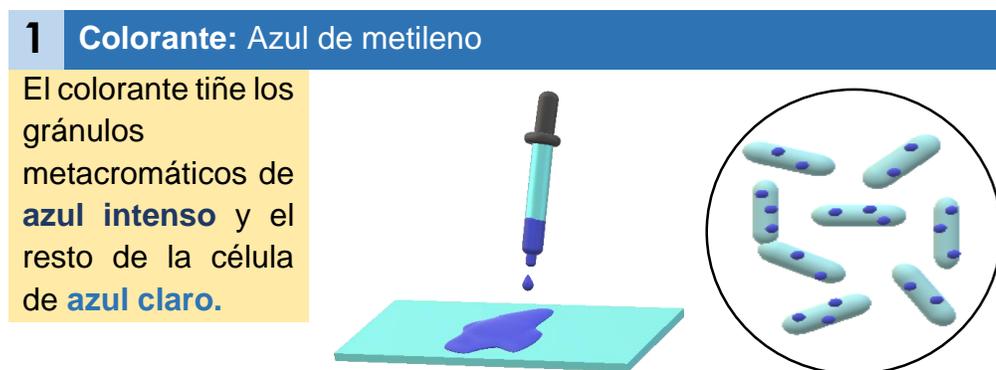


Figura 20. Esquema de la técnica de la tinción de Loeffler **.

** Esquema realizado por los autores.



En cuanto al procedimiento a seguir, de manera general es el mismo, sin embargo, existen diferentes autores en los que los tiempos que marcan para cada reactivo varían. Por tal motivo se ha realizado una comparación entre los diferentes tiempos que se manejan, tal como se muestra a continuación.

Tinción de Loeffler			
Referencia	Rodríguez E, Gamboa M, et al.	Koneman EW, Allen SD, et al.	Delgado A, Prieto S, et al.
Azul de metileno	5 min	1 min	3 min

Cuadro 12. Tiempos empleados para cada reactivo por diferentes autores para la tinción de Loeffler ^(33, 59, 65).

Como ya se mencionó anteriormente, en el laboratorio fueron seleccionados los mejores tiempos para la tinción, siendo en este caso para la tinción de Loeffler, 3 min para la solución reactivo de azul de metileno.

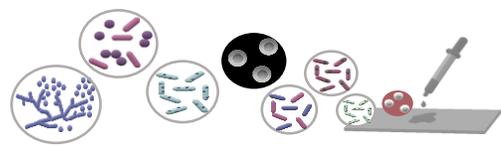
2.13.3.7 Tinción de esporas

Las endoesporas son formas de resistencia altamente deshidratadas y con una serie de cubiertas muy poco permeables, esto hace que sean difíciles de teñir, excepto si se calienta la preparación para permeabilizarlas; sin embargo, pueden evidenciarse en preparaciones a fresco o con diversas tinciones, pues las esporas aparecen como estructuras refringentes no coloreadas. Las endoesporas son más resistentes a condiciones adversas, entre ellas calor, radiaciones, desinfectantes y otras; además la endoespora ocupa una posición característica dentro de la célula, puede ser terminal, subterminal o central. La localización y tamaño de la espora varía con la especie bacteriana y generalmente estas características son de valor para su identificación ⁽⁶⁵⁾.

Es necesario conocer las características principales de *Bacillus cereus*, por ser una de las bacterias más representativas del tema y además, es de interés porque es empleada para la tinción de esporas en el libro elaborado.

2.13.3.7.1 *Bacillus cereus*

El género *Bacillus*, consiste en bacilos rectos Gram positivos que miden de entre 2-9 μm , aerobios estrictos o anaerobios facultativos, en su mayoría móviles, se agrupan en diplo o en cadenas de diferente longitud y forman endoesporas. Los miembros del género *Bacillus* son fáciles de aislar del ántrax o el aire del suelo y se encuentran entre los organismos más comunes que aparecen cuando las muestras



del suelo se estrían en placas de agar que contienen componentes nutritivos. La única especie altamente patógena para el hombre el *Bacillus anthracis*, que produce el carbunco, enfermedad que afecta primariamente al ganado doméstico ^(13, 26, 58).

Bacillus cereus es un organismo grande, comprendido entre 3-7 μm , no presenta cápsula y pueden disponerse en cadenas cortas o largas, su metabolismo es aerobio, pero puede ser anaerobio facultativo. Es responsable en muchas ocasiones de trastornos gastrointestinales y también ha sido asociado a cuadros graves como abscesos pulmonares, infecciones oculares, meningitis, osteomielitis, endocarditis e infecciones neonatales graves ^(13, 26, 58).

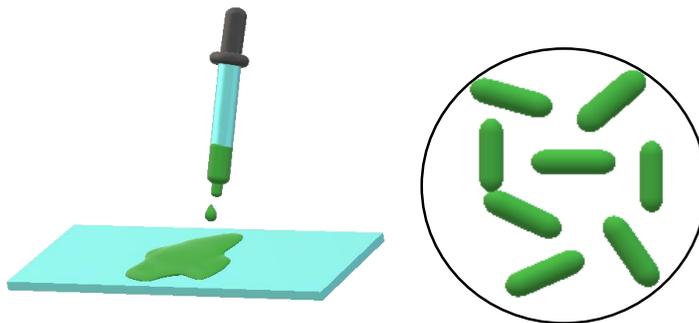
2.13.3.8 Tinción de Schaeffer Fulton

2.13.3.8.1 Fundamento de la tinción

Las endoesporas bacterianas son muy resistentes a los procedimientos tintoriales usuales. La aplicación de un solo colorante a una célula bacteriana que contiene una endoespora, sólo tiñe la célula, pero la espora se mantiene incolora, para lograr introducir el colorante dentro de la espora es necesario aplicar calor. La tinción de Schaeffer y Fulton emplea verde malaquita como colorante primario, el cual es eliminado posteriormente del resto de la célula bacteriana, pero no de la espora, mediante un enjuague con agua. Como colorante de contraste se emplea safranina, la cual tiñe la célula vegetativa ⁽⁷⁷⁾.

1 Colorante primario: Verde de malaquita y calentamiento a emisión de vapores.

Con el calentamiento, el colorante penetra las esporas y tiñe todas las células de **verde**

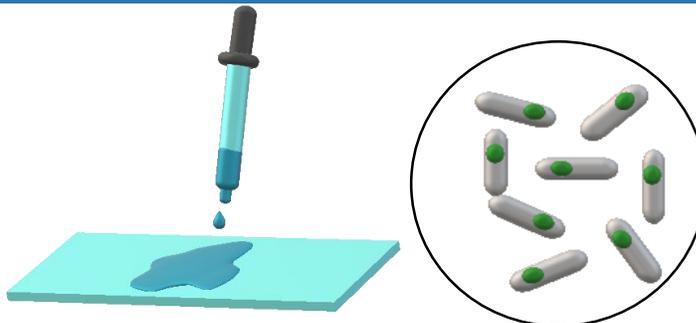


Continúa en la siguiente página



2 Decolorante: Agua

Colorante sale de las células y se quedan incoloras. Las esporas mantienen color **verde**



3 Colorante de contraste: Safranina

Las células se tiñen de **rosa**. Las esporas mantienen color **verde**.

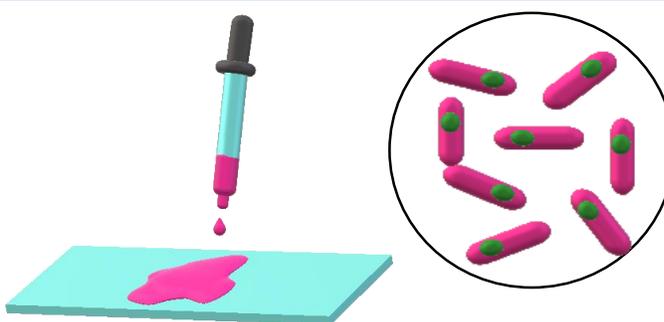


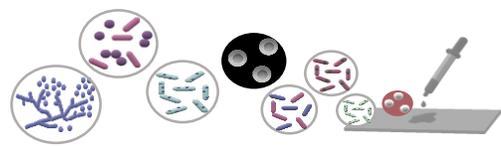
Figura 21. Esquema de la técnica de la tinción de Schaeffer Fulton **.

En cuanto al procedimiento a seguir, de manera general es el mismo, sin embargo, existen diferentes autores en los que los tiempos que marcan para cada reactivo varían. Por tal motivo se ha realizado una comparación entre los diferentes tiempos que se manejan, tal como se muestra a continuación.

Tinción de Schaeffer Fulton			
Referencia	Rodríguez E, Gamboa M, et al.	Delgado A, Prieto S, et al.	Olivas E
Verde de malaquita(a emisión de vapores)	10 min (sin que la preparación se seque o ebulle).	8 min	5 min
Lavado	30 s	Sin especificar	Sin especificar
Safranina	30 s	30 s	1 min

Cuadro 13. Tiempos empleados para cada reactivo por diferentes autores para la tinción de Schaeffer Fulton ^(33, 53, 65).

** Esquema realizado por los autores.



De igual manera, en esta tinción se seleccionaron los mejores tiempos en el laboratorio para cada reactivo, así como también, los mejores procedimientos. En este caso, para la tinción de Schaeffer Fulton, se colocó verde de malaquita por 15 min a emisión de calor directo con el mechero bunsen (por 3 s a la flama del mechero y alejando la flama del portaobjetos por 30 s). Posteriormente, se colocó safranina por 3 min.

Finalmente, a continuación se presenta un cuadro sinóptico a forma de resumen al tema de tinciones, así como los temas relacionados con esta, mismo que ya se han descrito con mayor detalle previamente.

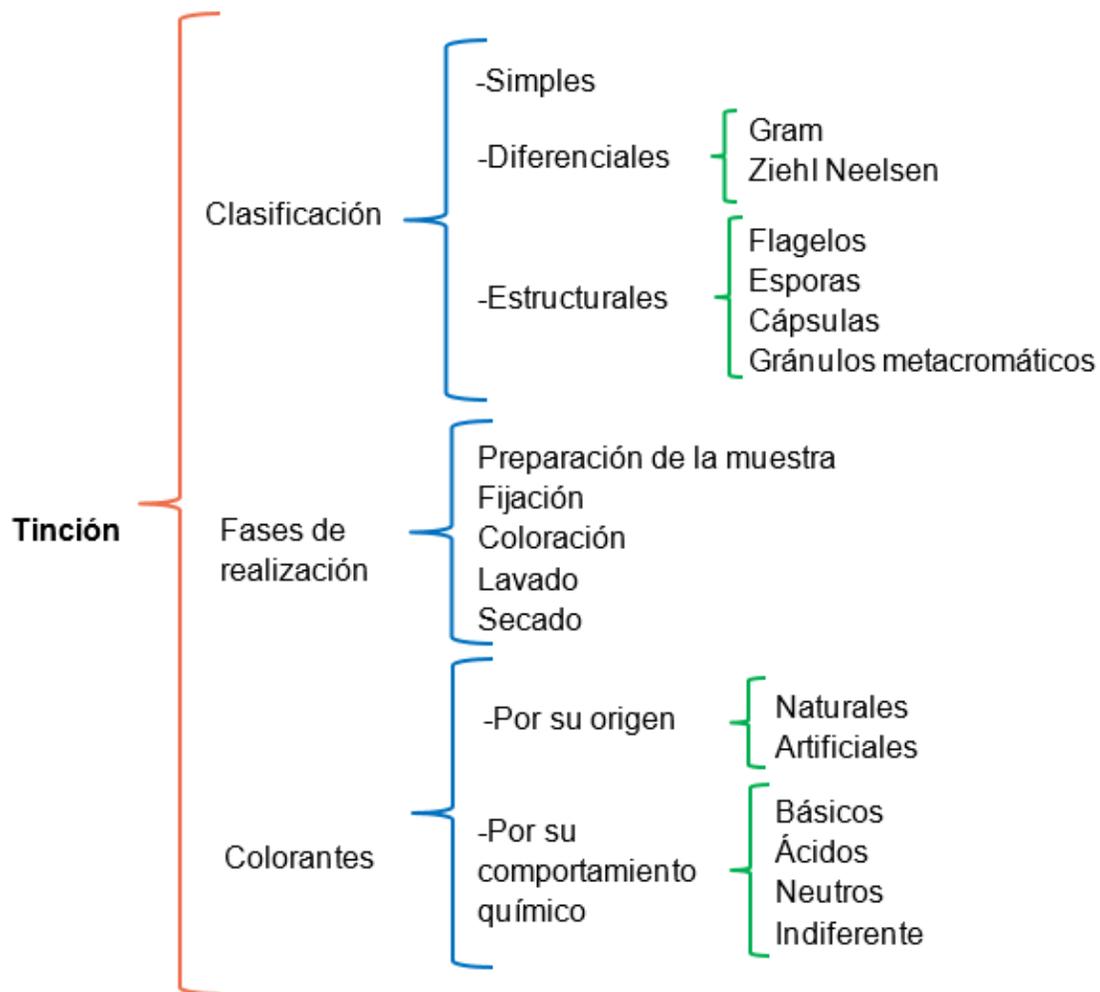
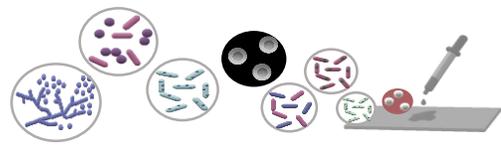


Figura 22. Aspectos importantes de la tinción ⁽³³⁾.



3. Planteamiento del problema

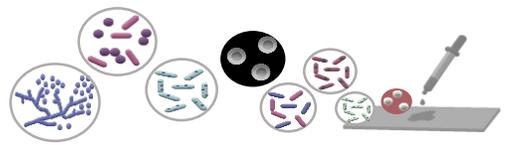
Las tinciones empleadas en el laboratorio de Microbiología son una herramienta esencial para la identificación de posibles microorganismos patógenos que afectan la salud de las personas, por ello una adecuada caracterización del microorganismo en la muestra clínica a analizar llevará finalmente a un correcto diagnóstico.

Existe información donde se describe únicamente como se realizan cada una de las tinciones, sin imágenes, esquemas y/o cuadros comparativos.

Con base en lo anterior, es de suma importancia la realización de un libro de tinciones básicas que contenga de manera gráfica cómo se realiza cada una de ellas paso a paso, de tal manera que sea una herramienta didáctica de consulta para los alumnos de noveno semestre del módulo de Bacteriología y Micología Médicas, de la orientación Bioquímica Clínica, de la carrera de Q.F.B. de la FES Zaragoza UNAM, así como para profesores y demás personal relacionado con el área.

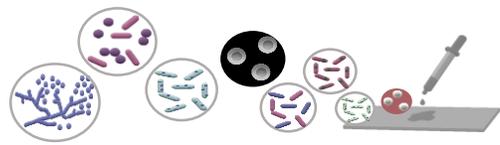
Así mismo, es necesario conocer la utilidad del libro de tinciones básicas que se elaborará, por lo que, contar con la opinión de los alumnos y profesores sobre la calidad de imágenes, secuencia de las tinciones, descripción de imágenes, entre otras características, es de suma importancia.

En este caso, el libro será únicamente sobre tinciones básicas, ya que éstas se emplean de manera continua en el laboratorio y si no son realizadas de la manera correcta puede afectar el resultado de lo que se está realizando.



4. Hipótesis

Se espera que una vez realizado el libro de tinciones básicas la opinión favorable de los alumnos de noveno semestre del área de Bioquímica Clínica de la carrera de Q.F.B. de la FES Zaragoza UNAM y profesores que imparten la materia de Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas, sea superior al 80%.



5. Objetivos

- Elaborar un libro de las tinciones básicas empleadas en el módulo de Microbiología Médica del área de Bioquímica Clínica de la carrera de Q.F.B. de la FES Zaragoza UNAM, con información de fácil comprensión y manejo, que sirva de apoyo al estudiante
- Proporcionar la fundamentación teórica y procedimientos a seguir en cada una de las tinciones con ilustraciones.
- Validar la utilidad del libro de tinciones básicas mediante la opinión de los alumnos de noveno semestre del área de Bioquímica Clínica de la carrera de Q.F.B. de la FES Zaragoza UNAM y profesores que imparten la materia de Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas.



6. Material y métodos

6.1 Métodos

Tipo de estudio: Observacional, prolectivo, transversal y descriptivo.

Población: Alumnos y profesores de noveno semestre del módulo de Bacteriología y Micología Médicas de la carrera de Q.F.B.

Criterios de inclusión: Alumnos inscritos y profesores del módulo de Bacteriología y Micología Médicas de la carrera de Q.F.B.

Criterios de Exclusión: Alumnos inscritos y profesores de otros módulos del área de Microbiología.

Criterios de Eliminación: Alumnos y profesores que no quieran participar en el proyecto.

Variables

-Dependiente: Libro de tinciones.

-Independiente: Opinión de los alumnos y profesores sobre el libro de tinciones básicas.

Técnicas

Describir en general el procedimiento de cada tinción.

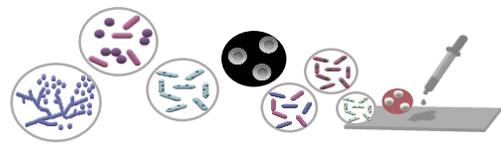
Análisis estadístico

Análisis de frecuencias de las opiniones de los alumnos y profesores.



6.2 Material

➤ Cepas	➤ Material	➤ Aparatos y equipo	➤ Reactivos
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12600)	-Bata	-Microscopio	-Agua
- <i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	-Guantes	-Cronómetro	-Aceite de inmersión
- <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	-Cubre bocas		-Cristal violeta
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-Cubreobjetos		-Yodo
- <i>Corynebacterium xerosis</i> (ATCC 1333)	-Portaobjetos		-Alcohol cetona
- <i>Bacillus cereus</i>	-Asa bacteriológica		-Safranina
- <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	-Mechero bunsen con manguera		-Verde de malaquita
- <i>Rhodococcus equi</i>	-Encendedor		-Tinta china marca "Azor"
- <i>Mycobacterium phlei</i> (ATCC 12298)	-Piseta		-Rojo Congo
- <i>Trichophyton rubrum</i> (ATCC 28188)	-Gradilla		-Mordente de cápsula
- <i>Microsporium canis</i> (ATCC 11621)	-Frascos goteros		-Carbolfucsina de Ziehl Neelsen
- <i>Microsporium nanum</i> (ATCC 28951)	-Pipetas Pasteur con bulbos		-Alcohol ácido
- <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	-Tubos de ensayo de 13X100 con y sin tapas		-Azul de metileno
-- <i>Microsporium gyseum</i>	-Frasco mediano de vidrio		-Carbolfucsina tergitol
	-Pinzas de metal		-Colorante de Albert
	-Vaso de precipitados de 100 mL		-Lugol
	-Tripié		-Azul de algodón lactofenol
	-Malla de asbesto		
	-Puente de vidrio		



7. Resultados

El libro que a continuación se presenta contiene las técnicas de tinciones básicas empleadas en el Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas del noveno semestre de la orientación Bioquímica Clínica de la carrera de Q.F.B. y las cuales están conformadas por:

- Tinción de Gram
- Tinción de Ziehl Neelsen
- Tinción de Kinyoun
- Tinción de tinta china
- Tinción de rojo Congo
- Tinción de Schaeffer Fulton
- Tinción de Albert
- Tinción de Loeffler
- Tinción de azul de algodón lactofenol

El libro contiene tanto el fundamento como las técnicas de tinción para cada una de las tinciones anteriores. De igual forma, se incluyen esquemas que facilitan la comprensión de cada técnica, así como de la interpretación de lo que se observa al microscopio, cuadros comparativos de las técnicas de tinción y tiempos que emplean diversos autores. Lo anterior se realizó de esa manera para que los temas que aborda el libro fueran de fácil comprensión para quienes lo utilicen.

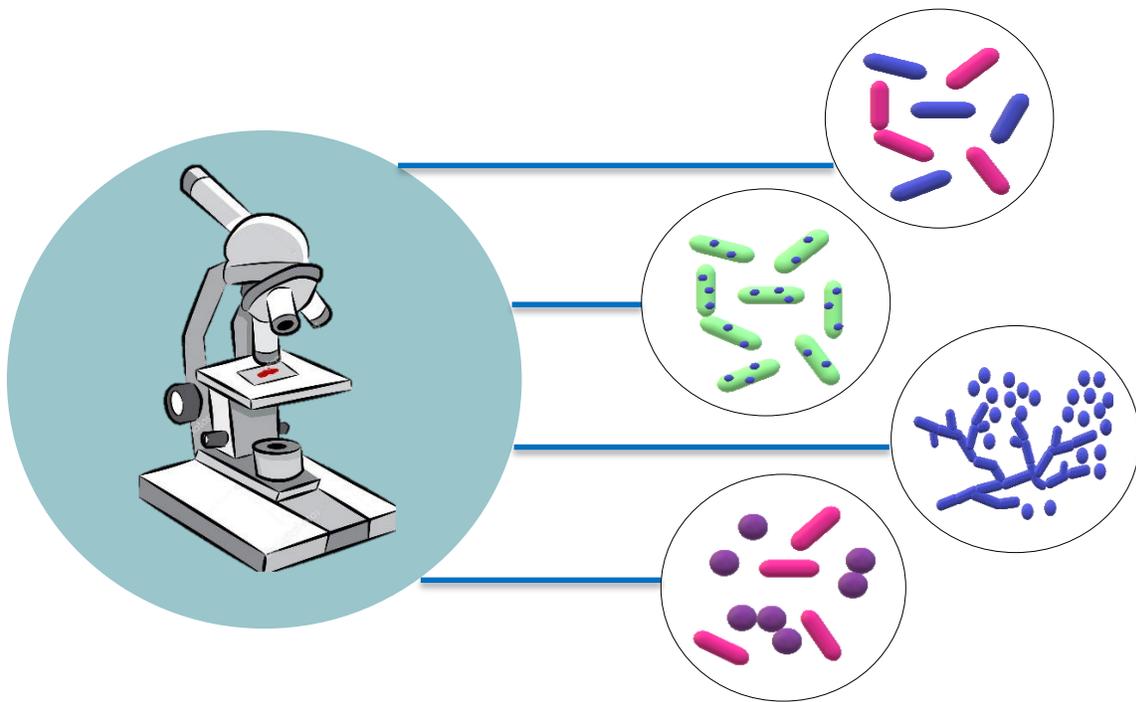


Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



Química Farmacéutico Biológica

Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología: un enfoque gráfico



Autores:

Marian Estefanía Cortes Cruz, Briseida Elizalde Cuevas, M. en C.
Roberto Cruz González Meléndez, Q.F.B. Manuel Orduña Sánchez.



ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Importancia de los microorganismos.....	7
1.2 Historia de la microbiología y su importancia con las tinciones.....	9
1.3 Fundamentos de microscopía óptica.....	12
1.4 El microscopio.....	12
1.4.1 Microscopio óptico.....	12
1.4.2 Características de un microscopio.....	16
1.4.3 Cuidado del microscopio.....	18
1.5 Bacterias.....	19
1.5.1 Morfología y agrupación microscópica bacteriana.....	22
1.5.1.1 Tamaño.....	22
1.5.1.2 Forma.....	23
1.5.1.3 Agrupación.....	23
1.5.1.4 Otras.....	25
1.6 Hongos.....	25
1.6.1 Clasificación.....	27
1.7 Examen microscópico.....	28
1.7.1 Examen de los microorganismos vivos.....	28
1.7.2 Preparaciones fijadas y coloreada.....	29
1.8 Colorantes.....	29
1.8.1 Clasificación.....	30
1.9 Mordentes.....	33
1.10 La tinción.....	33
1.10.1 La naturaleza de los procesos de tinción.....	33
1.10.1.1 Tinción mediante procesos físicos.....	33
1.10.1.2 Tinción mediante procesos químicos.....	34
1.10.1.3 Base química de la tinción.....	35
1.10.2 Realización de la tinción.....	36
1.10.2.1 Preparación de muestras.....	36
1.10.2.1.1 Extensión de la muestra.....	36
1.10.2.1.2 Secado.....	36
1.10.2.1.3 Fijación.....	37
1.10.2.2 Coloración.....	38
1.10.2.3 Decoloración.....	38
1.10.2.4 Lavado.....	38



1.10.2.5 Coloración de contraste.....	38
1.10.2.6 Observación al microscopio.....	38
1.10.3 Aspectos prácticos.....	39
2. Medidas de bioseguridad y manejo del RPBI.....	41
2.1 Normas generales de bioseguridad en el laboratorio.....	41
2.2 Manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos.....	42
3. Metodología.....	44
3.1 Fase pre-analítica.....	44
3.1.1 Indicaciones y precauciones generales.....	44
3.2 Fase analítica.....	59
3.2.1 Introducción.....	59
3.2.2 Realización de las tinciones.....	62
3.2.1.1 Tinciones diferenciales.....	63
3.2.1.1.1 Tinción de Gram.....	64
3.2.1.1.1.1 La reacción de Gram.....	64
3.2.1.1.1.2 Fundamento de la tinción de Gram.....	65
3.2.1.1.1.3 Variaciones de la reacción.....	67
3.2.1.1.1.4 Microorganismos empleados o de importancia.....	67
3.2.1.1.1.5 Procedimiento de la tinción de Gram.....	72
3.2.1.1.2 Tinción de Ziehl Neelsen o ácido resistente.....	83
3.2.1.1.2.1 Fundamento de la tinción de Ziehl Neelsen.....	83
3.2.1.1.2.2 Microorganismos empleados o de importancia.....	85
3.2.1.1.2.3 Procedimiento de la tinción de Ziehl Neelsen.....	86
3.2.1.1.3 Tinción de Kinyoun.....	95
3.2.1.1.3.1 Fundamento de la tinción de Kinyoun.....	95
3.2.1.1.3.2 Microorganismos empleados o de importancia.....	97
3.2.1.1.3.3 Procedimiento de la tinción de Kinyoun.....	98
3.2.1.2 Tinciones especiales.....	106
3.2.1.2.1 Tinción de cápsula.....	106
3.2.1.2.1.1 Microorganismos empleados o de importancia.....	107
3.2.1.2.1.2 Tinción de tinta china.....	108
3.2.1.2.1.2.1 Fundamento de la tinción de tinta china.....	108
3.2.1.2.1.2.2 Procedimiento de la tinción de tinta china.....	110
3.2.1.2.1.3 Tinción de rojo Congo.....	117
3.2.1.2.1.3.1 Fundamento de la tinción de rojo Congo.....	117
3.2.1.2.1.3.2 Procedimiento de la tinción de rojo Congo.....	119
3.2.1.2.2 Tinción de espora.....	125
3.2.1.2.2.1 Tinción de Schaeffer Fulton.....	125
3.2.1.2.2.1.1 Fundamento de la tinción de Schaeffer Fulton.....	125



3.2.1.2.2.1.2	Microorganismo empleado o de importancia.....	127
3.2.1.2.2.1.3	Procedimiento de la tinción de Schaeffer Fulton.....	128
3.2.1.2.3	Tinción de gránulos metacromático.....	136
3.2.1.2.3.1	Microorganismo empleado o de importancia.....	136
3.2.1.2.3.2	Tinción de Albert.....	136
3.2.1.2.3.2.1	Fundamento de la tinción de Albert.....	136
3.2.1.2.3.2.2	Procedimiento de la tinción de Alber.....	138
3.2.1.2.3.2	Tinción de Loeffler.....	146
3.2.1.2.3.2.1	Fundamento de la tinción de azul de metileno o de Loeffler.....	146
3.2.1.2.3.2.2	Procedimiento de la tinción de azul de metileno o de Loeffle....	147
3.2.1.3	Tinciones simples.....	154
3.2.1.3.1	Tinción de azul de algodón lactofenol.....	154
3.2.1.3.1.1	Fundamento de la tinción de azul de algodón lactofenol.....	154
3.2.1.3.1.2	Hongos dermatofitos.....	156
3.2.1.3.1.2	Procedimiento de la tinción de azul de algodón lactofenol.....	157
3.3	Fase post-analítica.....	166
3.3.1	Introducción.....	166
3.3.1.1	Clasificación y envasado de RPBI.....	166
3.3.1.2	Tratamiento.....	167
3.3.1.3	Almacenamiento temporal y disposición final.....	168
3.3.2	Procedimiento a realizar dentro del laboratorio.....	168
4	Comparación del libro "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología: un enfoque gráfico", con textos similares.....	172
5	Referencias.....	181
6	Anexos.....	189
6.1	Características de microorganismos empleados.....	189
6.2	Componentes de reactivos de tinción.....	193
6.3	Limitaciones de las técnicas de tinción.....	195
6.3.1	Tinción de Gram.....	195
6.3.2	Tinción de Ziehl Neelsen.....	196
6.3.3	Tinción de Albert.....	196
6.3.4	Tinción de Loeffler.....	196
6.3.5	Tinción de Tinta china.....	197
6.3.6	Tinción de azul de algodón lactofenol.....	197



1. Introducción

De manera general, se denomina tinción al proceso y resultado de teñir y, en el área de la Bioquímica Clínica consiste en teñir células o microorganismos. Se trata de una técnica empleada en los laboratorios con el objeto de optimizar la visión de aquello que se observa a través de un microscopio, por lo tanto, consiste en aplicar un colorante al material en estudio para que resulte más simple detectar determinados microorganismos.

Las tinciones serán siempre uno de los aspectos más importantes y el primer paso para la detección de microorganismos, pues una vez identificadas sus características como morfología (cocos, bacilos, etc.) y agrupación (tétradas, cadenas, etc.), así como su clasificación (Gram positivos, Gram negativos, etc.), será posible proceder a realizar las pruebas bioquímicas pertinentes. Por lo tanto, el primer paso en toda determinación de microorganismos es realizar una correcta tinción.

Tomando en cuenta lo anterior, se realizó el presente libro en el que se abordan las tinciones básicas que se utilizan en el Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas de noveno semestre de la orientación Bioquímica Clínica de la carrera de Q.F.B., de la FES Zaragoza UNAM, con el propósito de facilitar a los alumnos, profesores y demás personal afín al área de las Ciencias Químico Biológicas, los procedimientos que se llevan a cabo para la realización adecuada de estas tinciones.

Este libro está conformado por nueve técnicas de tinción que corresponden a las tinciones más empleadas a lo largo del semestre ya mencionado: tinción de Gram, de Ziehl Neelsen, de Kinyoun, de tinta china, de rojo Congo, de Schaeffer Fulton, de Albert, de Loeffler y tinción de azul de algodón lactofenol. Consta del fundamento teórico de cada una de las tinciones, de fotografías del procedimiento paso a paso, esquemas de la técnica de tinción, así como esquemas y fotografías de interpretación de las observaciones al microscopio, además de las principales consideraciones al momento de realizar cada tinción con base en el material y reactivos con que se disponen para el área Bioquímica Clínica de la carrera de Q.F.B. de la FES Zaragoza. Las fotografías fueron tomadas en la Clínica Universitaria de Atención a la Salud Zaragoza, con el propósito de facilitar la ejecución de los procedimientos de tinción.

La estructura de este libro está pensada en presentar de manera práctica la información, por lo que se pretende que quien emplee dicho libro, comprenda el porqué y el para qué de las tinciones que está realizando. Además, este libro será útil para alumnos de otras materias relacionadas con Microbiología y de manera general, para los demás profesionales de la salud interesados en el tema.



Por medio de este libro, se fomenta además, el uso de técnicas de bioseguridad y manejo de RPBI, para el cuidado personal y de trabajo dentro del laboratorio, debido a que una parte también importante es desechar correctamente las cepas que son empeladas en cada una de las tinciones que se realizan. Para tal efecto, se hace uso de la normatividad nacional, como lo es la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 de protección ambiental y salud ambiental para residuos peligrosos biológico-infecciosos, su clasificación y especificaciones de manejo, así como también el Manual Básico de Bioseguridad en Laboratorios del INR.

Para complementar lo anterior, en el libro se colocó una sección de “Indicaciones y precauciones generales”, que incluye lo que debe tomarse en cuenta antes y durante el desarrollo de las tinciones en el laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas, mismo que se encuentra ilustrado con sus respectivas fotografías.

Finalmente, este libro cumple con el cometido de ser un texto básico para los estudiantes, por lo que se espera que lo aprovechen adecuadamente, debido a la riqueza que posee al tratarse de un material inédito y didáctico, que cumple con el propósito de estandarizar y homogeneizar las técnicas empleadas en el Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas.



1.1 Importancia de los microorganismos

Los microorganismos juegan un papel muy importante en nuestras vidas. Algunos microorganismos causan enfermedades, pero la mayoría son completamente inofensivos. De hecho, no podríamos vivir sin ellos, pero sí podrían vivir sin nosotros ⁽¹⁾.

Los microorganismos están presentes en casi todos los lugares de la Tierra. A pesar de su tamaño tan pequeño, tienen una importancia tremenda en el mantenimiento de la vida en la Tierra. Debido a la diferencia en las actividades de los diferentes microorganismos, influyen en la vida de diferentes maneras. Algunos de ellos son muy útiles, por ejemplo, aquellos que fijan el nitrógeno atmosférico en formas biológicamente útiles, aquellos que reciclan materiales muertos al degradarlos en sustancias más simples y aquellos que ayudan en la preparación del vino, entre otros ⁽¹⁾.

Estos organismos microscópicos desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la vida en la Tierra, la fijación de gases y la descomposición de la materia animal y vegetal muerta en sustancias más simples que se utilizan al principio de la cadena alimentaria. Los biotecnólogos también pueden explotar las actividades de los microorganismos, para beneficiar a los humanos, como en la producción de medicamentos, enzimas y alimentos. También se utilizan para descomponer las aguas residuales y otros desechos tóxicos en materia segura, lo cual es conocido como biorremediación, por mencionar algunos ejemplos ⁽¹⁾.

En cuanto a las bacterias en los alimentos, como ejemplo destacado tenemos a la leche. La leche de una vaca saludable inicialmente contiene muy pocas bacterias, que provienen principalmente de la piel de la vaca y de los procedimientos para manejar la leche. La leche es un excelente medio de crecimiento para numerosas bacterias, y la cantidad de bacterias puede aumentar rápidamente a menos que la leche se procese adecuadamente. El crecimiento bacteriano puede deteriorar la leche o incluso representar un peligro grave para la salud si hay bacterias patógenas presentes. Las enfermedades que pueden transmitirse de una vaca infectada incluyen tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), fiebre ondulante (*Brucella abortus*) y fiebre Q (*Coxiella burnetii*). Además, la fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*) se puede transmitir a través de la leche de un manipulador de leche infectado ⁽²⁾.

Por lo tanto, podemos hablar de que el cuerpo humano es el hogar de billones de bacterias, virus, hongos y otros organismos diminutos. Estos microorganismos que pertenecen colectivamente a diferentes comunidades se denominan microbioma. El microbioma humano es una fuente de diversidad genética y no se considera que dos microbiomas humanos sean iguales. El microbioma es un componente esencial de la inmunidad y una entidad funcional que influye en el metabolismo y modula las interacciones farmacológicas. Se sabe desde hace



mucho tiempo que los microorganismos en el cuerpo humano desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la salud humana. Los microorganismos habitan en varios sitios del cuerpo humano, incluyendo la piel, la nariz, la boca y el intestino digestivo ^(3,4).

Para mantenerse saludables, los humanos necesitan microorganismos, y muchos microorganismos, necesitan un entorno específico proporcionado por el cuerpo humano para sobrevivir. Los seres humanos y los microorganismos, dependen de estas interacciones para crecer y mantenerse saludables. Diferentes especies de microorganismos, viven en diferentes lugares en y sobre el cuerpo humano y se adaptan a las condiciones en estos lugares. El hospedero humano y su flora microbiana constituyen un ecosistema complejo cuyo equilibrio sirve como un ejemplo notable de adaptación recíproca. Normalmente, los microorganismos, son responsables de la resistencia a la colonización por microorganismos patógenos exógenos. Sin embargo, a veces las bacterias patógenas potenciales entran en contacto cercano con el hospedero y son responsables de las infecciones oportunistas en hospederos inmunocomprometidos ^(3,4).

Los microorganismos que colonizan en humanos son comensales, es decir, coexisten sin dañar al ser humano, mientras que otros tienen una relación mutualista con su huésped humano que ambos son beneficiosos entre sí (enfoque simbiótico). Ciertos microorganismos realizan tareas específicas conocidas por ser útiles para el hospedero humano. Sin embargo, el papel de la mayoría de los microorganismos residentes no se conoce bien. Además, según las evidencias, ahora los científicos están convencidos de que las tendencias modernas de la dieta, el uso excesivo de antibióticos, la obsesión por la limpieza, los partos por cesárea, etc. están alterando el delicado equilibrio que contribuye a algunas de las enfermedades más desconcertantes, como el asma, las alergias, la obesidad, la diabetes, enfermedades autoinmunes, cáncer e incluso autismo ^(3,4).

Mucho antes del establecimiento de la Microbiología como ciencia, el agua era sospechosa de ser portadora de organismos productores de enfermedades. Pero no fue hasta 1854, cuando se demostró que una epidemia de cólera tuvo su origen en el agua contaminada, misma que se consideró más seriamente como una fuente de enfermedad. Desde entonces, se han realizado investigaciones continuas sobre la Microbiología de los suministros públicos de agua, incluido el desarrollo de procedimientos de laboratorio para determinar si el agua es potable o segura para el consumo humano ⁽⁵⁾.

En cuanto a la Microbiología médica y su importancia en la salud pública, se puede decir que tras el establecimiento de la teoría de los microorganismos de la enfermedad a mediados de la década de 1880 y el desarrollo de técnicas de laboratorio para el aislamiento de microorganismos (particularmente bacterias), los agentes causantes de muchas enfermedades comunes, las enfermedades fueron descubiertas en rápida sucesión. Algunas enfermedades



comunes y la fecha de descubrimiento de su agente causante ilustran este punto: ántrax (1876), gonorrea (1879), fiebre tifoidea (1880), malaria (1880), tuberculosis (1882), difteria (1883), cólera (1884), y el tétanos (1884). Algunos de los éxitos más notables de la Microbiología médica incluyen el desarrollo de vacunas a partir de la década de 1790, los antibióticos a mediados del siglo XX y la erradicación mundial de la viruela en 1977 ⁽⁵⁾.

Como se puede ver, existe una amplia variedad de microorganismos, tratados desde diferentes puntos de vista, sin embargo, no dejan de ser un tema de interés de estudio. Tales microorganismos se presentan en una sorprendente variedad de formas y tamaños, clasificándose principalmente en; bacterias, virus, hongos, protozoos, algas y archaeas. No obstante, son para nuestro interés el estudio principalmente de bacterias y hongos, debido a que a estos microorganismos son a los que se les realiza tinciones en el Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas de la carrera de Q.F.B., de noveno semestre del área terminal de Bioquímica Clínica, de las FES Zaragoza UNAM.

1.2 Historia de la Microbiología y su importancia con las tinciones

Los microorganismos son formas vivas cuyo tamaño es tan pequeño que generalmente no son visibles a simple vista, por lo tanto, el estudio de los microorganismos se ha venido desarrollando a lo largo de mucho tiempo. La Microbiología es la ciencia encargada del estudio y análisis de los microorganismos u organismos microscópicos. A su vez ésta se clasifica en ramas, como lo son: Bacteriología; siendo el estudio de bacterias, Virología; estudio de virus, Protozoología; estudio de protozoos, Micología; estudio de hongos, Ficología o Algología; estudio de las algas ⁽⁶⁾.

El descubrimiento en el siglo XVII de formas de vida invisibles a simple vista fue un hito importante en la historia de la ciencia, ya que a partir del siglo XIII se había postulado que las entidades "invisibles" eran responsables de la decadencia y la enfermedad. La palabra "microorganismo" fue acuñado en el último cuarto del siglo XIX para describir estos organismos, todos los cuales se pensaba que estaban relacionados. A medida que la Microbiología finalmente se convirtió en una ciencia especializada, se descubrió que los microbios son un grupo muy grande de organismos extremadamente diversos ⁽⁷⁾.

Además de poblar las superficies internas y externas del cuerpo humano, los microorganismos, abundan en el suelo, en los mares y en el aire. Los abundantes microorganismos, aunque generalmente pasan desapercibidos, proporcionan una amplia evidencia de su presencia, a veces de manera desfavorable, como cuando causan la descomposición de los materiales o propagan enfermedades, y a veces de manera favorable, como cuando fermentan el azúcar en el vino y la cerveza, hacen que el pan aumente, condimenten los quesos y producir productos de valor como los antibióticos y la insulina ⁽⁷⁾.



La Microbiología comenzó esencialmente con el desarrollo del microscopio. Aunque otros hayan visto microorganismos antes que él, fue Antonie van Leeuwenhoek, un pañero holandés cuya afición era el afilado de lentes y la fabricación de microscopios, fue el primero en proporcionar la documentación adecuada de sus observaciones. Sus descripciones y dibujos incluían protozoos de las entrañas de animales y bacterias de raspados de dientes. Sus registros fueron excelentes porque produjo lentes de aumento de calidad excepcional. Leeuwenhoek transmitió sus hallazgos en una serie de cartas a la Royal Society británica. A mediados de la década de 1670. Aunque sus observaciones estimularon mucho interés, nadie hizo un intento serio de repetir las o extenderlas. Los "animalcules" de Leeuwenhoek, como los llamaba, eran rarezas de la naturaleza para los científicos de su época, y el entusiasmo por el estudio de los microbios creció lentamente. Solo más tarde, durante el resurgimiento en el siglo XVIII de una controversia sobre si la vida podía desarrollarse a partir de material no vivo, se hizo evidente la importancia de los microorganismos en el esquema de la naturaleza y en la salud y el bienestar de los humanos ⁽⁷⁾.

Posteriormente se habló de la "Generación espontánea" versus "Generación de vida biótica". Los primeros griegos creían que los seres vivos podían originarse a partir de materia no viva (abiogénesis) y que la diosa Gea podía crear vida a partir de piedras. Aristóteles descartó esta idea, pero aún sostenía que los animales podían surgir espontáneamente de organismos diferentes o del suelo. Su influencia sobre este concepto de la generación espontánea todavía se sentía hasta el siglo XVII, pero hacia fines de ese siglo comenzó una cadena de observaciones, experimentos y argumentos que finalmente refutaron la idea ⁽⁷⁾.

A pesar de que Francesco Redi, un médico italiano, refutó en 1668 que las formas de vida más elevadas podían originarse de manera espontánea, los defensores del concepto afirmaron que los microorganismos eran diferentes y que efectivamente surgían de esta manera. Nombres ilustres como John Needham y Lazzaro Spallanzani fueron adversarios en este debate a mediados del siglo XVIII. En la primera mitad del siglo XIX, Franz Schulze y Theodor Schwann fueron figuras importantes en el intento de refutar las teorías de la abiogénesis hasta que Louis Pasteur finalmente anunció los resultados de sus experimentos concluyentes en 1864. En una serie de experimentos magistrales, Pasteur demostró que solo los microorganismos preexistentes podrían dar lugar a otros microorganismos (biogénesis). El conocimiento moderno y preciso de las formas de bacterias se puede atribuir al botánico alemán Ferdinand Cohn, cuyos resultados principales se publicaron entre 1853 y 1892. La clasificación de bacterias de Cohn, publicada en 1872 y ampliada en 1875, dominó el estudio de estos organismos a partir de entonces ⁽⁷⁾.

En cuestión de los microorganismos y la enfermedad, Girolamo Fracastoro, un erudito italiano, adelantó la idea, ya a mediados del 1500, que el contagio es una infección que pasa



de una cosa a otra. Una descripción de lo que se pasa a lo largo del eludido descubrimiento hasta finales de 1800, cuando el trabajo de muchos científicos, Pasteur entre ellos, determinó el papel de las bacterias en la fermentación y la enfermedad. Robert Koch, un médico alemán, definió el procedimiento (los postulados de Koch) para probar que un organismo específico causa una enfermedad específica ⁽⁷⁾.

El fundamento de la Microbiología se colocó de manera segura durante el período de aproximadamente 1880 a 1900. Los estudiantes de Pasteur, Koch y otros descubrieron en una sucesión rápida una gran cantidad de bacterias capaces de causar enfermedades específicas (patógenos). También elaboraron un extenso arsenal de técnicas y procedimientos de laboratorio para revelar la ubicuidad, la diversidad y las capacidades de los microbios ⁽⁷⁾.

Posteriormente, en el siglo XX, surgieron ciertos avances, todos estos desarrollados ocurrieron en Europa. No fue hasta principios del siglo XX que la Microbiología se estableció en América. Muchos microbiólogos que trabajaron en América en este momento habían estudiado en Koch o en el Instituto Pasteur de París. Una vez establecida en América, la Microbiología floreció, especialmente con respecto a disciplinas relacionadas como la bioquímica y la genética. En 1923, el bacteriólogo estadounidense David Bergey estableció la referencia principal de la ciencia, cuyas ediciones actualizadas se siguen utilizando en la actualidad ⁽⁷⁾.

Desde la década de 1940, la Microbiología ha experimentado un período extremadamente productivo durante el cual se han identificado muchos microorganismos causantes de enfermedades y se han desarrollado métodos para controlarlos. Los microorganismos también se han utilizado eficazmente en la industria; Sus actividades se han canalizado en la medida en que los productos valiosos son ahora vitales y comunes ⁽⁷⁾.

El estudio de los microorganismos también ha mejorado el conocimiento de todos los seres vivos. Los microorganismos son fáciles de trabajar y, por lo tanto, proporcionan un vehículo simple para estudiar los complejos procesos de la vida; como tales, se han convertido en una herramienta poderosa para estudios en genética y metabolismo a nivel molecular. El conocimiento del metabolismo básico y los requerimientos nutricionales de un patógeno, por ejemplo, a menudo conduce a un medio para controlar la enfermedad o infección ⁽⁷⁾.

Para el estudio de tales microorganismos es necesario tener presentes las características que los definen, como es el caso de la morfología, la cual se refiere al tamaño, forma y disposición de las células. La observación de células microbianas requiere no solo el uso de microscopios, sino también la preparación de las células de una manera apropiada para el tipo particular de microscopía. Durante las primeras décadas del siglo XX, el microscopio de luz compuesto fue el instrumento comúnmente utilizado en Microbiología. Los microscopios de luz tienen



un factor de ampliación habitual de 1000X y una ampliación útil máxima de aproximadamente 2000X. Las muestras pueden observarse después de haber sido teñidas por una de varias técnicas para resaltar algunas características morfológicas o en preparaciones vivas sin teñir como un "montaje húmedo" ⁽⁷⁾.

Los microorganismos son organismos vivos muy pequeños, tan pequeños que la mayoría de ellos son invisibles. La mayoría solo se puede ver con un microscopio, que amplía su imagen para que podamos verlos, de ahí la importancia de la microscopía y por supuesto, del empleo de las técnicas de tinción correctas y de sus conocimientos teóricos para su adecuada interpretación.

1.3 Fundamentos de microscopía óptica

En general, la microscopía se utiliza en Microbiología con dos propósitos básicos: la detección inicial de microorganismos y la identificación preliminar o definitiva de los mismos. El examen microscópico de muestras clínicas se utiliza para detectar células bacterianas, elementos micóticos, parásitos (huevos, larvas o formas adultas) e inclusiones víricas presentes en las células infectadas. Las propiedades morfológicas características se pueden utilizar para la identificación preliminar de la mayoría de las bacterias y se utilizan para la identificación de muchos hongos y parásitos ⁽⁸⁾.

Para el examen microscópico de los microorganismos se puede utilizar el microscopio óptico o el microscopio electrónico. Así mismo, para la detección de los microorganismos es importante aplicar algún método de tinción para su posterior observación en el microscopio, ya que esta es la base para después poder realizar la inoculación de la bacteria u hongo en algún medio de cultivo ⁽⁹⁾.

1.4 El microscopio

El microscopio es un instrumento que produce imágenes agrandadas de objetos pequeños, lo que permite al observador una vista extremadamente cercana de las estructuras diminutas en una escala conveniente para el examen y análisis. El microscopio puede proporcionar una imagen dinámica (como con los instrumentos ópticos convencionales) o una que sea estática (como con los microscopios electrónicos de barrido convencionales) ⁽⁹⁾.

Todos los microscopios utilizan lentes para aumentar la imagen de una célula de modo que se puedan observar sus detalles estructurales. Además del aumento, es importante la resolución de un microscopio, que es una medida del detalle más pequeño del objeto que se puede observar y es la propiedad que permite observar dos puntos adyacentes como puntos separados ⁽⁹⁾.



1.4.1 Microscopio óptico

El tipo de microscopio más conocido es el microscopio óptico, de luz o de campo claro, en el que se usan lentes de vidrio para formar la imagen. En general, el microscopio óptico se usa para observar estructuras internas o detalles de las superficies celulares ⁽⁹⁾.

Los microscopios ópticos pueden ser simples, consistiendo en una sola lente, o compuesto, consistiendo en varios componentes ópticos en línea. La lupa de mano puede magnificar alrededor de 3 a 20X. Los microscopios simples de lente única pueden aumentar hasta 300X y son capaces de revelar bacterias, mientras que los microscopios compuestos pueden aumentar hasta 2,000X. Un microscopio simple puede resolverse por debajo de 1 micrómetro (μm ; una millonésima de metro); un microscopio compuesto puede resolver hasta aproximadamente $0.2 \mu\text{m}$ ⁽⁹⁾.

Las imágenes de interés se pueden capturar mediante fotografía a través de un microscopio, una técnica conocida como fotomicrografía. Desde el siglo XIX, esto se hizo con película, pero en su lugar ahora se usa mucho la imagen digital. Algunos microscopios digitales han prescindido de un ocular y proporcionan imágenes directamente en la pantalla del ordenador. Esto ha dado lugar a una nueva serie de microscopios digitales de bajo costo con una amplia gama de posibilidades de imágenes, incluida la micrografía de lapso de tiempo, que ha puesto al alcance del microscopía joven o aficionado las tareas previamente complejas y costosas ⁽⁹⁾.

En la microscopía óptica, toda la luz desde el espécimen y los alrededores es recolectada por el objetivo para formar una imagen contra un fondo brillante. El espécimen generalmente se tiñe y se observa mientras está iluminado. En otras palabras, se trata de la forma más simple de microscopía, en la cual la luz pasa a través del espécimen. Además, su iluminación no se altera por aditamentos que cambien las propiedades de la luz como por ejemplo con polarizadores, filtros o algo semejante. Estamos muy familiarizados con este tipo de microscopía debido a que es el más utilizado, en donde además, el espécimen es iluminado desde abajo y observado desde arriba ⁽¹⁰⁾.

Cabe mencionar que existen otros tipos de microscopios, pero se hace énfasis en el microscopio óptico debido a que es el que se emplea en el libro. Sin embargo, se ha hecho una recopilación con las características principales de algunos de los otros microscopios en comparación con el microscopio óptico, lo cual se puede observar en el cuadro 1.

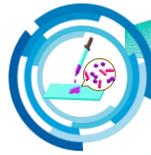


Microscopio	Características	Utilidad
Óptico, de campo claro o de luz	-Luz visible -Hasta 0.23 μm -Muestra sobre un fondo brillante	-Tinciones -Fácil utilización -Características morfológicas generales de bacterias, hongos, algas y protozoos.
De campo oscuro	-Luz visible difractada -Muestra brillante sobre un fondo oscuro.	-Microorganismos de difícil tinción -Determinar la motilidad de microorganismos o algunas características morfológicas especiales
De contraste de fases	-Luz difractada -Muestra con diferentes grados de brillo y contraste	-Estructuras internas de las células -Organismos vivos y sin teñir
De fluorescencia	-Luz ultravioleta -Muestra fluorescente sobre un fondo no fluorescente	-Inmunofluorescencia -Auramina
Electrónico	-Haces de electrones -Estructuras menores de 0.23 μm	-Virus -Ultraestructuras

Cuadro 2. Características y utilidad de los microscopios más comunes ⁽¹⁰⁾.

Ahora bien, es necesario conocer las partes principales que conforman a un microscopio, para de esta manera poder ejecutarlo adecuadamente y evitar cualquier tipo de daño que se le pueda causar por un mal uso. Estas son ⁽¹¹⁾:

- Pie: Tiene la función de soportar el resto del microscopio y está formado por una estructura metálica pesada.
- Platina: Se trata de la estructura que sostiene la muestra que se desea observar.
- Tubo: En este se encuentra instalado el sistema óptico, siendo generalmente binoculares (dos oculares) que facilitan la visión con los dos ojos y los revólveres portaobjetivos, con los que se pueden cambiar los objetivos instantáneamente, sin necesidad de desenfocar la muestra. El enfoque se realiza a través de unos tornillos conocidos como “tornillos macrométricos” y “tornillos micrométricos”, que permiten desplazamientos verticales gruesos y finos, respectivamente.
- Objetivos: Estos son los que se encuentran insertados en el revólver del microscopio, distinguiéndose principalmente dos tipos:
 - Objetivos en seco: En éstos, el aire se interpone entre la lente y el preparado. Los objetivos más comúnmente utilizados son de 4X, 10X y 40X.



- Objetivos de inmersión: Se distinguen de los anteriores porque entre la lente y el preparado se debe interponer un medio transparente con un índice de refracción (n) superior al del aire ($n = 1$), y semejante al del vidrio ($n = 1,5$). El medio utilizado es un aceite de inmersión, como por ejemplo el aceite de cedro. Son aptos para la observación de bacterias, finas estructuras, etc.
- Ocular: Permite observar la imagen del objeto formada por el objetivo, actuando como una lupa. Está compuesta por dos lentes: la inferior o colectora, y la superior, o lente ocular.
- Sistema de iluminación: Situado debajo de la platina, está formado por:
 - Lámpara o espejo de iluminación.
 - Condensador: Posee la función de concentrar sobre el preparado los rayos luminosos procedentes de la fuente de luz.
 - Diafragma: Situado debajo del condensador, sirve para graduar la cantidad de luz que llega al objeto.
 - Filtros de luz: Son placas de vidrios, coloreadas, que dejan pasar las radiaciones de longitud de onda deseadas, absorbiendo las restantes.

Los componentes anteriormente mencionados se pueden observar en la figura 1.

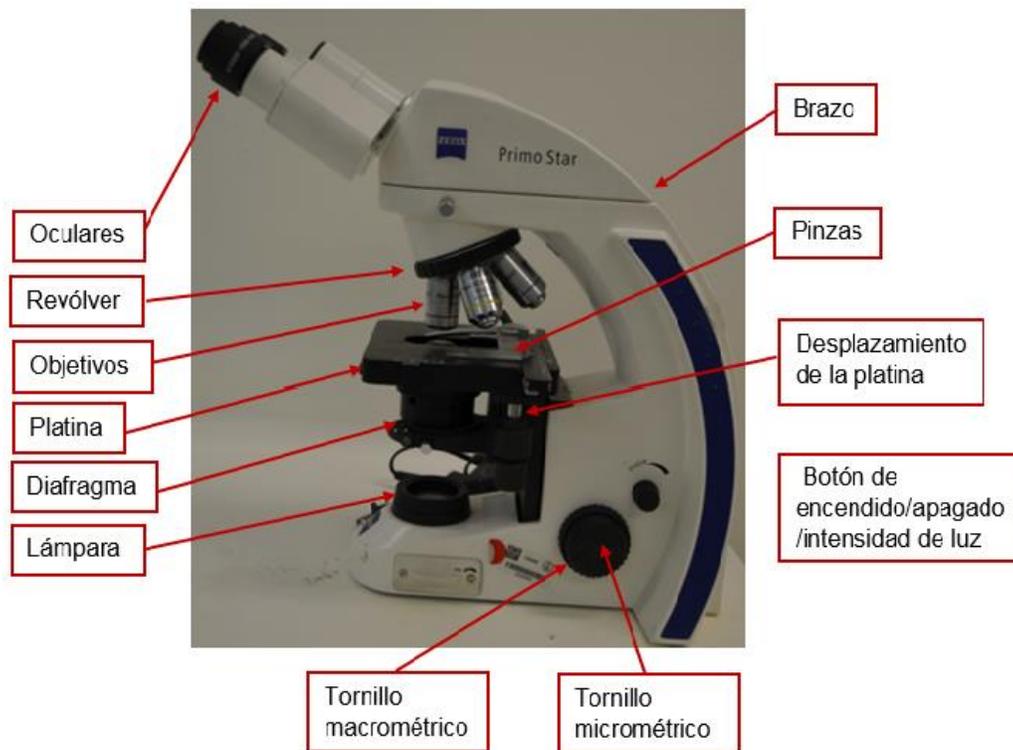


Figura 2. Componentes de un microscopio *.

* Fotografía tomada por los autores.



1.4.2 Características de un microscopio

Tres factores son necesarios para ver los organismos al microscopio: aumento (o amplificación), resolución y contraste ⁽¹²⁾.

- **Resolución**

Se trata de la capacidad de producir imágenes independientes de pequeñas partes de un objeto que se encuentran a poca distancia, en otras palabras, se trata de la capacidad para distinguir los detalles finos. La resolución se expresa en unidades lineales, generalmente micrómetros (μm) ⁽¹²⁾.

La resolución, o la medida en que se define el detalle de un objeto magnificado, es un componente necesario también, ya que el poder de resolución de un microscopio debe permitir que dos células aparezcan como objetos distintos para identificarlos. Para los microscopios de luz, el poder de resolución es máximo cuando se coloca aceite entre la lente del objetivo y el frotis para evitar que los rayos de luz se dispersen a medida que pasan a través del frotis. El aumento total con el lente con aceite de inmersión es 1,000 veces el aumento original. Este aumento y capacidad de resolución son necesarios para observar a las bacterias ⁽¹²⁾.

- **Contraste**

En microscopía, el contraste se refiere a la diferencia que existe entre el área de interés (bacteria, hongo, etc.) con respecto al fondo en una imagen observada en el microscopio. Ésta diferencia está establecida por las diferencias entre los puntos más brillantez y oscuros o por la diferencia en color ⁽¹³⁾.

El contraste dependerá de lo que se esté analizando bajo el microscopio, por lo tanto, considerando esto se presentarán diferentes contrastes. Las células vivas, por ejemplo, son muy traslucidas y no muy coloreadas, haciendo difícil distinguir sus características específicas. Creando contraste en el espécimen será posible que el observador pueda identificar las estructuras clave. Esto se puede lograr con la manipulación de la iluminación del microscopio, sin embargo, muchas veces esto no es suficiente, por lo que se hace uso de colorantes, de ahí la importancia de las técnicas de tinción ⁽¹³⁾.

En resumen, la percepción de un objeto bajo el microscopio depende del hecho de que muestre cierto grado de contraste con el medio circundante, como resultado de que a través de él se transmite menos luz del medio. Por lo tanto, para aumentar el grado de contraste se utilizan procedimientos de tinción ⁽¹³⁾.



- **Aumento**

El poder de aumento de un microscopio es una expresión de la cantidad de veces que el objeto que se examina parece agrandarse y es una proporción adimensional. Para tener un microscopio que cumpla con nuestras necesidades satisfactoriamente es muy importante que tenga suficiente poder de aumento. Dicho aumento focal suele representarse con el signo X después de un número, por ejemplo 5X, 10X en los oculares y 10X, 43X en los objetivos. En otras palabras, el aumento para la microscopía óptica es el producto del lente objetivo (generalmente 10X, 20X, 40X o 100X) y la lente ocular o el ocular (10X). Por lo tanto, la apariencia de objetos observados a baja potencia, como 10X, sería el producto de 10 por 10 o 100 veces el tamaño original ^(9,14).

Es instintivo, cuando uno desea examinar los detalles de un objeto, acercarlo lo más posible al ojo. Cuanto más cerca esté el objeto del ojo, mayor será el ángulo que subtiende en el ojo y, por lo tanto, más grande aparecerá el objeto. Sin embargo, si un objeto se acerca demasiado, el ojo ya no puede formar una imagen clara. El uso de la lente de aumento entre el observador y el objeto permite la formación de una "Imagen virtual" que puede verse con comodidad. Para obtener la mejor imagen posible, la lupa debe colocarse directamente delante del ojo. El objeto de interés se lleva hacia el ojo hasta que se ve una imagen clara del objeto. Aunque el aumento se puede incrementar prácticamente sin límite, no ocurre lo mismo con la resolución, que está limitada por las propiedades físicas de la luz ^(9,14).

- **Oculares**

Otra característica menos relevante es la cantidad de oculares. Existen microscopios que tienen dos oculares, es decir, binoculares y, otros que tienen un solo ocular, monoculares. La diferencia más destacada entre ellos es la comodidad que brinda cada uno. Por ejemplo, si se va a utilizar el microscopio por tiempos prolongados es preferible emplear un microscopio binocular, debido que el uso prolongado de microscopios monoculares genera dolor de cabeza y fatiga visual en muchas personas. Estos últimos deberían emplearse únicamente para personas que lo utilizarán por un período de tiempo reducido ⁽¹⁵⁾.

- **Objetivos**

Este sistema se integra con varios lentes; la lente que queda más cerca del objeto a analizar es la inferior y se le denomina lente frontal, es plano convexa y su diámetro es más pequeño cuanto mayor sea el aumento que proporcione. Los objetivos producen el aumento de las imágenes de los objetos de estudio. Los más habituales son de 2 tipos: secos y de inmersión. Los primeros son los más empleados, se utilizan sin colocar alguna sustancia entre objetivos y la preparación, pues entre la lente frontal del objetivo y la preparación sólo hay aire, su



número de objetivos depende de cada microscopio, pero los más frecuentes son: 6X, 10X, 20X, 45X y 60X. Por su parte, el objetivo de inmersión está conformado por un complejo sistema de lentes y requieren de la presencia de un líquido entre la lente frontal y la preparación, cuyo índice de refracción debe ser el adecuado para permitir una mayor luminosidad, por lo cual es necesario colocar una gota de aceite (generalmente de cedro) entre el objetivo y la preparación, de manera que la lente entre en contacto con dicho aceite, el cual se coloca con el propósito de concentrar los rayos de luz que provienen el foco luminoso, siendo los objetivos para este caso los de 100X ^(16,17).

Las lentes objetivos son partes delicadas y cualquier golpe podría dañarlas, por lo que se debe tratarlas con precaución.

1.4.3 Cuidado del microscopio

El microscopio es un valioso instrumento. Para que pueda servir eficazmente año tras año, es necesario que se le otorgue el cuidado adecuado. Por este motivo, se deben recordar las siguientes indicaciones ^(18,19):

- a) Enchufar y posteriormente encender el microscopio.
- b) Colocar la preparación en la platina del microscopio.
- c) Primero se debe colocar el objetivo de menor aumento, ya que permitirá la observación de una panorámica del preparado y así tener una ubicación de las zonas de interés para su posterior análisis. Posteriormente, podrán emplearse los objetivos de mayor aumento.
- d) Evitar mover el microscopio cuando la lámpara se encuentre encendida, debido a que el filamento de dicha lámpara es muy sensible.
- e) Para desplazarlo hacia otro lugar se deben emplear los correspondientes tornillos de fijación que posee el microscopio. Procurar que los movimientos no sean muy rápidos.
- f) No se debe tocar las lentes de los oculares y objetivos con los dedos, con el fin de evitar ensuciarlos con la grasa natural que se tiene en las manos.
- g) Retirar la preparación del microscopio.
- h) Después de usar el microscopio, debe limpiarse cuidadosamente y sin tallar, con el papel adecuado para vidrio o papel seda, lo cual garantiza la eliminación de la suciedad excesiva en los objetivos por el uso del aceite de inmersión y que estos no se rayen (revisar nota al final de este apartado).
- i) Verificar siempre al final de su uso que no hayan quedado preparados sobre la platina o residuos de estos.



j) Al terminar de emplearlo, el microscopio se debe dejar con el objetivo de menor aumento, la platina lo más próxima posible a él y, protegido con la cubierta o funda protectora que le corresponda.

k) Procurar dejar el microscopio en un mismo lugar siempre. En general, debe evitarse en lo más posible el transporte diario o constante de cualquier aparato en el laboratorio.

Nota: Si se cubren los microscopios cuando no se utilicen (las fundas de plástico son adecuadas) no tendrán que limpiarse tan a menudo. Inevitablemente se acumulará algo de polvo, suciedad y otros agentes que puedan dañarlo y esto reducirá la nitidez de las lentes. El polvo en la lente puede causar confusión, especialmente porque permanece aun cuando no se enfoque la muestra. El vidrio óptico se raya fácilmente, de modo que hay que tener cuidado cuando se limpie, para ello se debe limpiar primero el polvo suelto con un pincel blando ⁽²⁰⁾.

Es preciso limpiar las partes mecánicas con un paño suave, en algunos casos éste puede humedecerse con xilol para disolver ciertas manchas de grasa, aceite de inmersión, etc. La limpieza de las partes ópticas requiere precauciones especiales: tiene que emplearse un papel muy fino y nunca deben tocarse las lentes del ocular, objetivo y condensador con los dedos, ya que las huellas digitales perjudican la visibilidad y cuando se secan resulta difícil eliminarlas. Para limpiar los objetivos se recomienda humedecer un papel de lentes con éter y suavemente pasarlo por la superficie varias veces sin realizar presión. El aceite de inmersión que queda sobre la lente frontal del objetivo de inmersión debe quitarse inmediatamente después de finalizada la observación, para lo cual puede pasarse el papel de lentes impregnado con una gota de xilol ⁽¹⁶⁾.

Es importante tomar en cuenta que los lentes de los microscopios nunca deberán limpiarse con nada distinto al papel de lentes, (fácil de adquirir en tiendas de artículos fotográficos), porque de otro modo, sufrirán daño ⁽¹⁶⁾.

1.5 Bacterias

Las bacterias son organismos de una sola célula que pueden vivir en diferentes medios. Algunas bacterias pueden sobrevivir en un ambiente ácido, como las bacterias del intestino humano y otras pueden sobrevivir en un medio salino, como las bacterias que viven en el fondo del océano. Sus tamaños pueden variar; sin embargo, la mayoría de las bacterias tienen un diámetro de alrededor de $0.2\mu\text{m}$ y una longitud de $2-8\mu\text{m}$ ⁽²¹⁾.

Contienen diferentes estructuras tanto internas como externas con funciones específicas, las cuales se puede observar en la figura 2.

a) Estructuras externas



- *Pared celular*

Las bacterias están protegidas por paredes celulares rígidas que forman envolturas y rodean a las células. Las paredes celulares de las bacterias están hechas de peptidoglicano, que es una cadena de polisacárido ⁽²¹⁾.

-Pared celular en las bacterias Gram positivas. Las bacterias Gram positivas cuentan con una pared celular grande (± 25 nm), compuesta por una gruesa capa de peptidoglicanos en la que se pueden encontrar, intercalados en esta, componentes únicos de bacterias Gram positivas como son ácido teicoico (polímeros de glicerol o ribitol unidos a grupos fosfato) y ácido lipoteicoico (ácido teicoico unido a lípidos desde la membrana celular). Estas estructuras de carga negativa le confieren parte de la carga negativa superficial de la bacteria, además estimulan la respuesta inmune y sirven de adhesinas para algunas bacterias ⁽²¹⁾.

-Pared celular en las bacterias Gram negativas. En contraste, la pared celular de las Gram negativas es muy pequeña (± 3 nm). Esta capa delgada de peptidoglicano permite la presencia de un espacio periplásmico, el cual es importante debido a que hacia el exterior, las bacterias Gram negativas cuentan con una distintiva membrana externa ⁽²¹⁾.

-Membrana externa de las bacterias Gram negativas. La capa exterior de las bacterias Gram negativas (± 7.5 nm), está compuesta por una bicapa de lípidos unida a la capa de peptidoglicano por la lipoproteína de Braun. Hacia la capa interna está formada por fosfolípidos (similar a la membrana celular) y hacia el exterior por el lípido A del lipopolisacárido (LPS). Intercaladas en la membrana externa se encuentran las proteínas hidrofóbicas denominadas “proteínas de membrana externa” (OMP). Entre la membrana externa y la pared celular existe una región denominada espacio periplásmico, en él, se encuentran: enzimas digestivas, proteínas de transporte de sustratos (fijadoras), quimiorreceptores y además pueden acumular enzimas ⁽²¹⁾.

Estructura	Gram positivas	Gram negativas
Peptidoglicano	Capa gruesa	Capa delgada
Ácido teicoico	Presente	Ausente
Membrana externa	Ausente	Presente
Lipopolisacáridos	Ausente	Presente
Lipoproteínas	Ausente	Presente
Espacio periplásmico	Ausente	Presente

Cuadro 2. Diferencias estructurales entre bacterias Gram negativas y Gram positivas ⁽²²⁾.



Las estructuras que conforman de manera general a una bacteria, se ilustran en la siguiente imagen, mismas que serán explicadas más adelante:

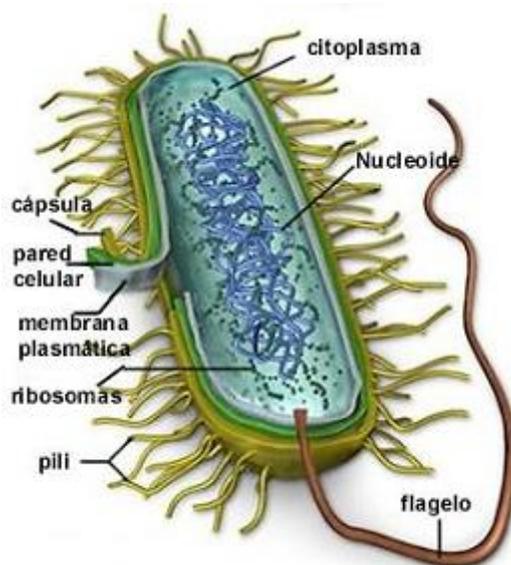


Figura 2. Estructuras generales de las bacterias ⁽²³⁾.

- *Cápsula*

Las cápsulas están presentes principalmente en bacterias patógenas. La función principal de una cápsula es proteger la bacteria del sistema inmunológico del huésped (el organismo en el que la bacteria puede crecer y vivir) ⁽²⁴⁾.

- *Estructuras de locomoción*

Entre las estructuras más comunes de locomoción se encuentran los flagelos, los cuales no necesariamente están presentes en todas las bacterias. Los microorganismos que las poseen tienen la capacidad de motilidad. Los flagelos son estructuras delgadas de alrededor de 20 μm , pero largos (3 a 12 μm), apéndices filamentosos ondulados. Una bacteria puede tener un flagelo o un grupo de flagelos ⁽²⁴⁾.

b.) Estructuras internas

- *Ribosomas*

Los ribosomas son pequeñas partículas que se encuentran en el citoplasma. Son los sitios donde se lleva a cabo la traducción del ARNm, y también son responsables de la síntesis de proteínas ⁽²⁴⁾.



- *Mesosomas*

Estas son las invaginaciones plegadas que están presentes en la membrana plasmática. Estas invaginaciones son importantes para la respiración celular de la célula ⁽²⁴⁾.

- *Nucleoide*

Aparte del ADN y el ARN, las bacterias también contienen plásmidos. Los plásmidos son los fragmentos de ADN circular presentes fuera del núcleo. En el nucleoide bacteriano, las moléculas de ADN y ARN están presentes ⁽²⁴⁾.

La estructura a observar en el microscopio dependerá del tipo del microorganismo del que se trate, sin embargo, de manera general se puede decir que existen estructuras en común para la mayoría de las bacterias. A diferencia de los hongos, los cuáles son más variados en cuanto a sus estructuras, por lo que en estos sí es preciso explicarlo por separado dependiendo de cuál se trate.

A continuación, se tratará la morfología bacteriana en general y más adelante se detallarán ciertas características específicas de las bacterias que fueron empleadas en este trabajo y de otras más que no fueron utilizadas en el trabajo pero que son muy representativas de cada tinción.

Cuando se indaga en las particularidades de la morfología bacteriana los textos destacan la existencia de estructuras esenciales: nucleoide (que determina la cualidad distintiva de las bacterias dentro del universo viviente), citoplasma, membrana citoplasmática y pared celular. Hay otras que, a diferencia de las anteriores, pueden o no estar presentes; pueden incluso perderlas y ello no implica la muerte al microorganismo, de ahí que se les designe como estructuras no esenciales ⁽²⁴⁾.

1.5.1 Morfología y agrupación microscópica bacteriana

Entre las principales características de las bacterias se encuentran su tamaño, forma, estructura y tipo o modo de agrupación. Todas estas características van a constituir la morfología propia de las células bacterianas ⁽²⁵⁾.

1.5.1.1 Tamaño

Es una característica para cada tipo bacteriano; se puede medir con gran exactitud y fiabilidad a pesar de que sólo puede observarse la bacteria al microscopio. El tamaño generalmente es muy pequeño (entre 0.1 y 4 micras). Conocer al menos su forma y tipo de agrupación va a ser esencial y previo a cualquier proceso de identificación y clasificación taxonómica como se verá a continuación ⁽²⁵⁾.



1.5.1.2 Forma

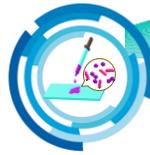
Con respecto a la forma que va a presentar esa bacteria como organismo individual se ha de considerar que las bacterias suelen adoptar fundamentalmente alguna de las formas siguientes ⁽²⁵⁾:

- a. *Oval o esférica* (0.5 a 1 μm). Denominadas “cocos” (del griego y latín “baya”). Muchos de estos microorganismos presentan diferentes formas de agrupación, hecho que es muy útil para su identificación.
- b. *Cilíndrica o en forma de bastón* (0.5 a 20 μm). Denominadas “bacilos” (en latín “bastón”). Algunos de estos bacilos tienden a agruparse, aunque con menos tendencia que en el caso de las formas cocoides.
- c. *Espiral o helicoidal* (1 a 100 μm). Cuando las bacterias adoptan formas espirales recibe el nombre de espirilo; en estos casos predominan las células individuales y más o menos aisladas. Dichas formas también se llaman sacacorchos o espiroquetas y son muy características de ciertas especies. En general hay muchas diferencias en cuanto a la longitud de este tipo de bacterias, el número de espiras y la amplitud de cada una de ellas. En algunos casos son muy pequeñas con espirales muy apretadas o enrolladas y en otros casos todo lo contrario.
- d. *Filamentosa*. Cuando adoptan forman filamentosas suelen presentar al microscopio óptico un aspecto muy similar al de los hongos
- e. *Formas intermedias de algunos casos anteriores*. Existen formas intermedias como es el caso de los cocobacilos y vibriones. Los primeros, como su nombre indica, son formas bacterianas intermedias entre cocos y bacilos, como su nombre indica, son formas bacterianas intermedias entre cocos y bacilos, que en muchos casos, más que una forma característica de una u otra especie, corresponden a la etapa inicial del desarrollo de muchos bacilos, aunque no siempre es así. Los segundos son formas curvas más o menos alargadas y, en ciertas ocasiones, algo retorcidas.

1.5.1.3 Agrupación

Con respecto a la agrupación celular, es importante considerar que no todas las formas bacterianas se agrupan. Por el contrario, existen otras formas bacterianas donde su agrupación es muy característica y muy útil a la hora de establecer clasificaciones taxonómicas, siendo las formas cocoideas las más frecuentes en este sentido, y en menor proporción las formas bacilares ⁽²⁵⁾.

De acuerdo con lo dicho, las estructuras cocoideas se pueden agrupar de la siguiente forma ⁽²⁵⁾.



- a) Diplococos: es cuando se divide la bacteria en un plano permaneciendo unidos en forma de parejas.
- b) Estreptococos: es cuando la bacteria se divide en planos paralelos quedando unidos entre si formando cadenas.
- c) Tétradas o tetracocos: es cuando la bacteria se divide en dos planos perpendiculares entre sí formando grupos característicos de 4 células.
- d) Estafilococos: es cuando la división tiene lugar en 3 planos distintos formando como consecuencia de esto racimos de cocos.
- e) Sarcinas: esta agrupación se forma como consecuencia de la división de la bacteria en 3 planos perpendiculares originando agrupaciones cuboidales de en torno a 8 cocos o más, como se observa en la figura 3.

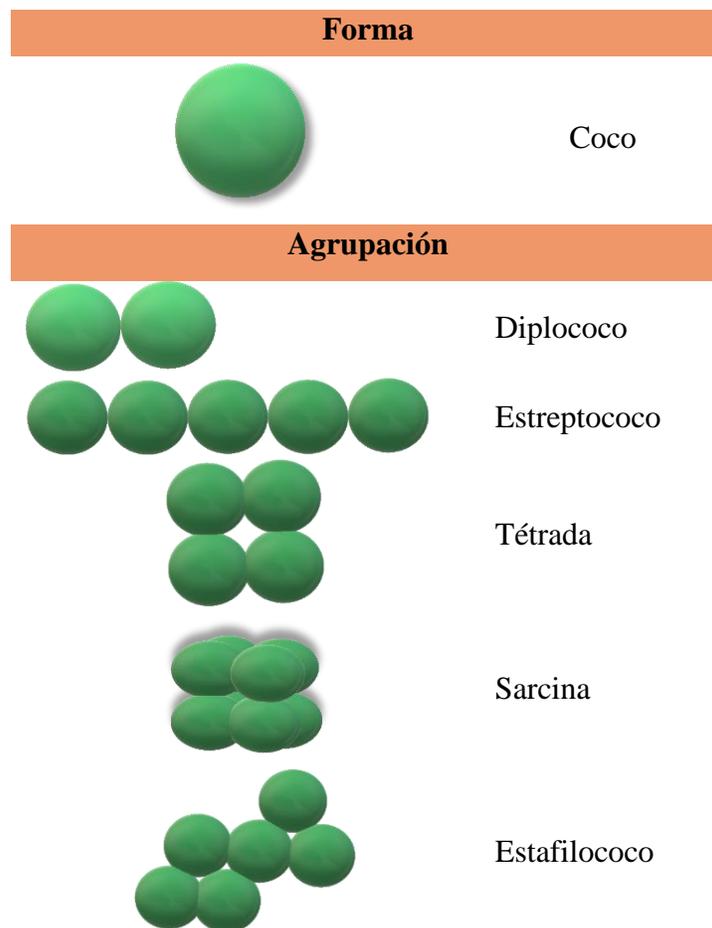
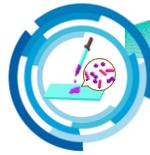


Figura 3. Agrupaciones de tipo cocoideo **.

Las agrupaciones bacilares son menos frecuentes, pero, pero en ocasiones, pueden aparecer como ⁽²⁵⁾:

** Esquema realizado por los autores.



- a) Diplobacilos: corresponden a dos bacilos unidos como pareja y originados por la división en un mismo plano.
- b) Estreptobacilos: son agrupaciones de bacilos a modo de cadenas.
- c) Formas irregulares: en ocasiones los bacilos pueden agruparse adquiriendo formas muy irregulares análogas a las letras chinas. Este tipo de asociación es característico del género *Corynebacterium*. (Figura 4).

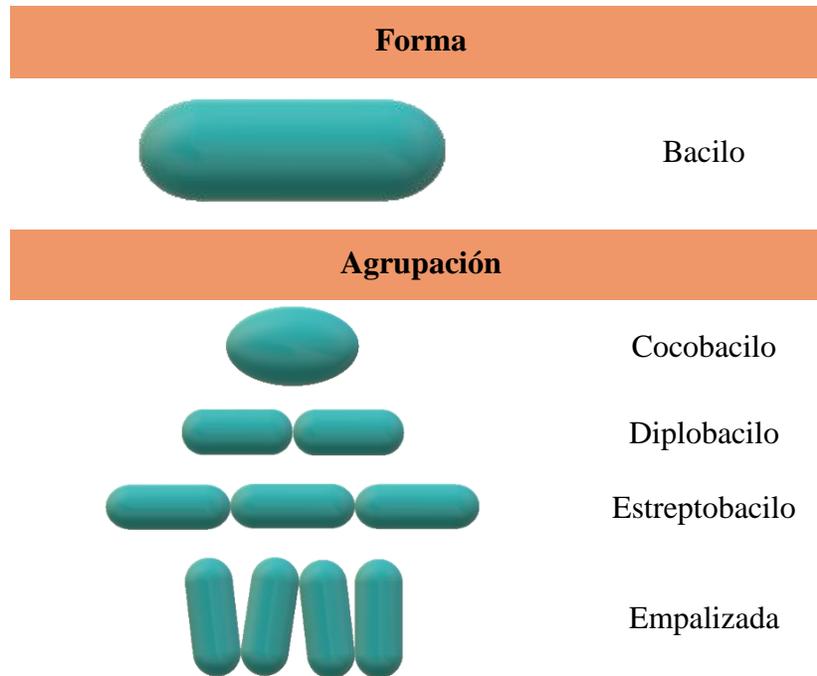


Figura 4. Agrupaciones de bacilos **.

1.5.1.4 Otras

Existen también algunas especies de bacterias que presentan otras características además de las ya mencionadas y que pueden ser detectadas a través de las técnicas específicas de tinción, como es el caso de la presencia de flagelos, cápsulas, esporas, etc, y que igualmente forman parte de la morfología de las bacterias ⁽²⁵⁾.

1.6 Hongos

Los hongos tienen características diferentes a las bacterias, por ejemplo; poseen pared celular compuesta mayormente de quitina, son organismos mayormente heterótrofos, carecen de clorofila, su modo de nutrición es por absorción, se clasifican como saprófitos (saprobios), parásitos y mutualistas. Además, requieren de un ambiente húmedo para desarrollarse

** Esquema realizado por los autores.



adecuadamente. Su reproducción puede ser sexual o asexual. Su hábitat natural es el suelo, la mayoría son aerobios estrictos y no poseen la maquinaria para realizar fotosíntesis ⁽²⁶⁾.

En cuanto a las condiciones de temperatura, generalmente crecen entre los 0 °C y 55 °C, aunque su temperatura ideal podría considerarse entre los 20 °C y 30 °C. Aunque de cualquier forma pueden clasificarse en ⁽²⁶⁾:

-Psicrófilos: Se desarrollan entre 0 °C y 20 °C, con temperatura óptima entre 15 °C y 17 °C.

-Mesófilos: Se desarrollan entre los 0 °C a 50°C y con una temperatura óptima entre 15 °C y 40 °C.

-Termófilos: Con un rango de crecimiento entre 20 °C y 50 °C.

Por otra parte, pueden ser unicelulares o pluricelulares. Los hongos pluricelulares poseen una estructura conformada por una malla filamentosa de hifas, agrupadas formando lo que se conoce como micelio, caracterizado conforme su distinción citoplasmática en ⁽²⁶⁾:

-Hifas septadas: Donde sus células son individualizadas, cada una con su núcleo.

-Hifas cenocíticas: Donde sus células son de apariencia multinucleada.

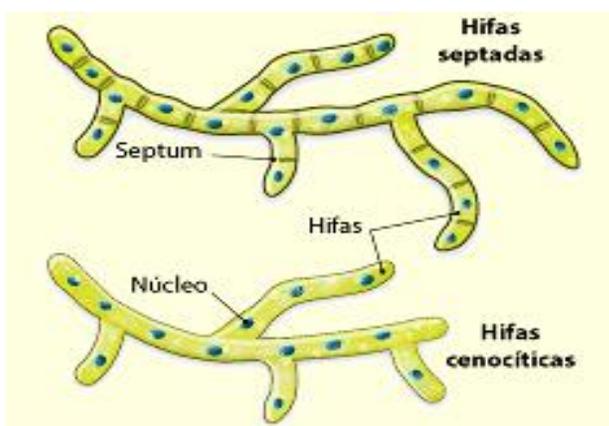
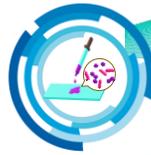


Figura 5. Diferencia entre una hifa cenocítica y una hifa septada ⁽²⁶⁾.

Además de esta clasificación, pueden ser a su vez clasificados dependiendo a su tamaño:

-Macrosifonado: >1 µm

-Microsifonado: <1 µm



El micelio asume tanto la función vegetativa como la reproductiva. La primera otorga crecimiento y obtención de alimentos y, la segunda la producción de esporas (reproducción sexual), no obstante, pudiendo ocurrir de forma asexual. La respiración de los hongos puede ser aeróbica (en presencia de oxígeno) o anaeróbica facultativa, sobreviviendo en ambientes con baja oxigenación ⁽²⁶⁾.

A continuación, en la figura 6 se muestra la estructura interna de las células fúngicas.

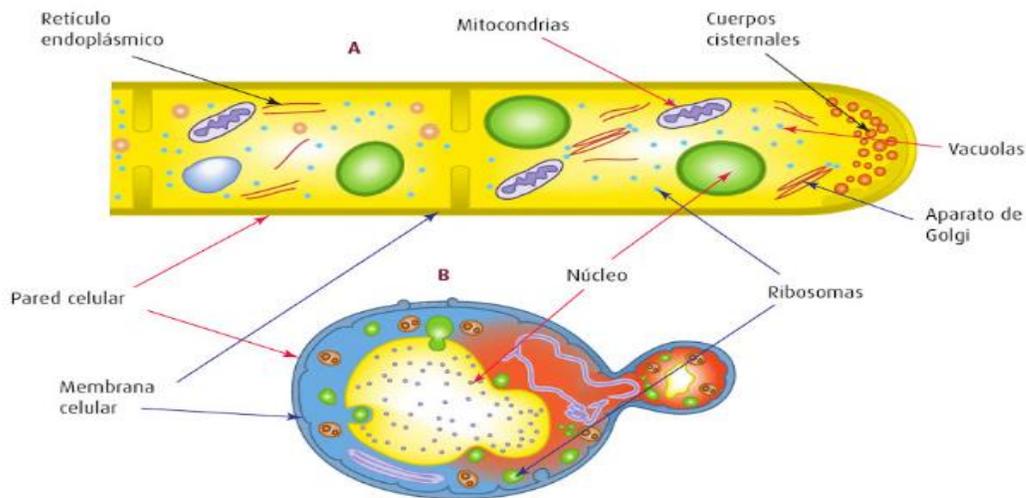


Figura 6. Estructura interna de las células fúngicas ⁽²⁶⁾.

1.6.1 Clasificación

Los hongos son clasificados de forma sistemática en: Zigomicetos, Basidiomicetos, Ascomicetos y Deuteromicetos:

-Ascomycota: La característica básica de los ascomicetos es la presencia de ascos. Un ascó es una célula en forma de saco que contiene un número determinado (normalmente 8) de ascósporas. Ejemplo: *Aspergillus*, *Claviceps*, *Neurospora* ^(27, 28, 29).

-Basidiomycota: Esta clasificación abarca a los hongos de mayor complejidad morfológica, entre los que se encuentran las conocidas setas, así como los yesqueros, hongos gelatinosos, carbones y royas, entre otros. Este tipo de hongos producen esporas sexuales sobre células con aspecto de bastón, denominadas basidios. Su función dentro de la naturaleza es esencial, sobre todo los descomponedores ^(27, 28, 29).

-Zygomycota: Estos hongos se encuentran por lo general en el queso, pan y otros alimentos en descomposición. Están formando cigoto hongos, de ahí el nombre zygomycota. Las esporas se producen en saco, llamado esporangio, el cual es de forma redonda. La pelusa



grisácea visto en el pan y la comida en descomposición es en realidad moho de esporangios maduros. Bajo el microscopio se ven como cabeza de un alfiler. Cuando se rompe el esporangio se abren cientos de esporas se liberan. Ejemplo: *Mucor*, *Rhizopus* (el moho del pan) y *Albugo* ^(27, 28, 29).

-Deuteromycota: Estos organismos son conocidos como hongos imperfectos porque carecen de la reproducción sexual. Se reproducen por esporas asexuales llamadas conidios. La mayoría de los hongos provoca enfermedades a los seres humanos como la tiña, pie de atleta. Otros ejemplos son *Alternaria*, *Colletotrichum* y *Trichoderma* ^(27, 28, 29).

1.7 Examen microscópico

El examen microscópico nos informa de la presencia o no de microorganismos, de su morfología, de sus características tintoriales, etc. Es el primer paso que nos permitirá orientar el resto del examen, que se completará con el cultivo y aislamiento de las bacterias en los medios adecuados, el examen bioquímico, etc ⁽³⁰⁾.

1.7.1 Examen de los microorganismos vivos

Este examen hace posible la observación de los microorganismos vivos. Es la llamada observación vital, este tipo de examen se utiliza principalmente para la investigación de los caracteres de movilidad bacteriana, en estudios de morfología (especialmente bacterias en espiral cuya morfología se altera al secarse y teñirse), agrupación, estructuras bacterianas, la visibilidad de elementos fúngicos con blanco de calcoflúor o mediante el tratamiento con KOH, etc ^(30,31).

Para este tipo de estudio, se pueden utilizar tanto directamente los productos patológicos como cultivos en medios sólidos o líquidos de los microorganismos. Para ello, es suficiente con la suspensión del microorganismo en un medio líquido consiguiendo su visibilidad al microscopio de campo claro por el distinto índice de refracción entre el medio y el microscopio. Los métodos que se emplean para este tipo de examen son ^(30,31).

a. Preparaciones húmedas.

b. Examen en fresco. Consiste en la observación del material a examinar, entre porta y cubreobjetos, sin ningún tipo de coloración ni sustancia clarificante. Este procedimiento tiene mucha utilidad para hongos, protozoarios y helmintos, sin embargo, es muy poco usado en los diagnósticos bacteriológicos, ya que sólo permite identificar la forma de las bacterias y la presencia de movilidad, por tal motivo es que se recurre a los métodos de tinción en el laboratorio, existiendo una amplia variedad de estos. Las preparaciones deben obtenerse de material clínico fresco o de cultivos recientes y realizados en medios adecuados (en caso



contrario, es posible que se produzcan modificaciones en la morfología y la movilidad bacteriana)^(30,31).

Por medio del examen en fresco del exudado vaginal es posible observar la presencia de trichomonas y levaduras, en el varón una uretritis supurada puede estar causada por trichomonas, siendo útil para su diagnóstico el examen en fresco del exudado en suero fisiológico. Así mismo, el examen en fresco de una pequeña cantidad de heces diluida en solución salina permite la visualización de las formas vegetativas y quísticas de los protozoos, y en su caso los huevos de helminto^(30,31).

Muestras como sedimentos urinarios, esputos o exudados pueden utilizarse directamente, mientras que si el material es demasiado espeso puede diluirse con solución salina estéril o agua destilada. La preparación se observa al microscopio con objetivo de inmersión y con poca intensidad de luz, para facilitar la observación^(30,31).

1.7.2 Preparaciones fijadas y coloreadas

Una de las limitaciones de la microscopía de campo claro es el escaso contraste y por ello se pueden utilizar colorantes para teñir las células y aumentar así el contraste facilitando su observación. Este tipo de preparaciones son las más frecuentes en Microbiología, tanto las obtenidas directamente a partir de muestras clínicas como las obtenidas a partir del desarrollo de cultivos y por ello serán abordadas con mayor detenimiento más adelante^(1, 19).

1.8 Colorantes

Los colorantes son compuestos orgánicos y son los reactivos necesarios para las tinciones, que facilitan la observación al microscopio. Cada tipo de colorante tiene afinidad por determinados componentes celulares y generalmente, actúan mediante reacciones de intercambio iónico entre el colorante y los elementos celulares. Muchos de los colorantes utilizados con frecuencia en Microbiología están cargados positivamente (catiónicos) y se combinan fuertemente con constituyentes celulares cargados negativamente (aniónicos), como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos^(2, 32).

Los numerosos tipos de colorantes utilizados para teñir microorganismos tienen características en común como son: contienen grupos cromóforos, grupos con dobles enlaces conjugados que dan al colorante su color, y pueden unirse a las células por enlaces iónicos, covalentes o, cromóforos⁽³²⁾.

Dos propiedades generales son necesarias antes de que cualquier sustancia sea útil como un colorante: la sustancia debe estar coloreada o lista en la tinción para obtener un producto coloreado y, algunas partes de la tinción deben conservar preferentemente el color mientras



que otras partes no lo hacen. Estas dos condiciones se imponen porque el objetivo es aumentar el contraste de color en el sistema de objetos. Este objetivo se logra normalmente mediante una tinción directa del microorganismo, mientras el fondo queda sin colorear. La mayoría de los colorantes se utilizan para teñir directamente la célula u objeto de interés, pero algunos colorantes (p. ej., la tinta china y la nigrosina) se utilizan en tinciones negativas, A veces es conveniente utilizar un proceso de tinción *negativa* o *de fondo* el cual tiñe el fondo y deja los microorganismos inalterados, lo que se tiñe no es la célula y las células no teñidas aparecen como objetos brillantes sobre un fondo oscuro. Además de hacer que todo el microorganismo sea más visible, se han empleado colorantes para ^(32, 33):

1. Mostrar la estructura y detalles más finos de los microorganismos.
2. Revelar la distribución y la naturaleza química de los constituyentes celulares.
3. Determinar el pH y los potenciales de oxidación y reducción.
4. Diferenciar entre organismos.

1.8.1 Clasificación

Los tipos de colorantes empleados en las tinciones se pueden clasificar de acuerdo a su origen o a su comportamiento químico ^(32, 34).

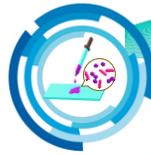
a.) Por su origen

A su vez, estos pueden clasificarse en colorantes naturales y artificiales, mismos que se explican a continuación ^(32, 34):

1. *Colorantes naturales*: Estos son los extraídos de animales, pero sobre todo de las plantas. Por ejemplo, la hematoxilina extraída del tronco de una planta que por oxidación origina a hematina o el carmín que es extraído de un animal, la cochinilla.
2. *Colorantes artificiales*: Son productos de derivados químicos, obtenidos en su mayor parte de alquitrán de hulla, son colorantes de anilina y se distinguen los colorantes que conocemos comúnmente; los colorantes ácidos y básicos, que pueden estar formando sales, así como colorantes neutros.

b.) Por su comportamiento químico

De manera general, un colorante, dependiendo de su estructura físico-química, se unirá de una forma más estable a la estructura que se tiñe. En general, están constituidos fundamentalmente por un anillo bencénico al que se unen diferentes radicales, de los cuales uno de ellos será coloreado y corresponderá al radical cromóforo, que frecuentemente es de carácter nitroso o de tipo amido, azo, alqueno, ciano, tiociano, etc. Por otra parte, al anillo bencénico se le unirán radicales no coloreados o auxocromos que pueden ser de tipo



hidroxilo, amino, metilo, vanilo, etc., que no poseen capacidad tintorial pero le dan estabilidad al colorante, pudiendo facilitar que se tiñan los radicales coloreados ^(32, 34).

Los colorantes ionizables pueden dividirse en clases generales según la naturaleza de su grupo cargado:

1. *Colorantes ácidos*: También son llamados aniónicos. Poseen grupos cargados negativamente como carboxilos (-COOH) e hidroxilos fenólicos (-OH). Los colorantes ácidos, debido a su carga negativa, se unen a estructuras de la célula cargadas positivamente. Se trata de aquellos donde la carga del radical colorante es negativa, corresponden fundamentalmente a colorantes citoplasmáticos, debido a que los citoplasmas de las células se consideran básicos, captando muy bien los colorantes ácidos. En este grupo de colorantes se encuentran eosinas, auraminas, entre otras ^(32, 34).

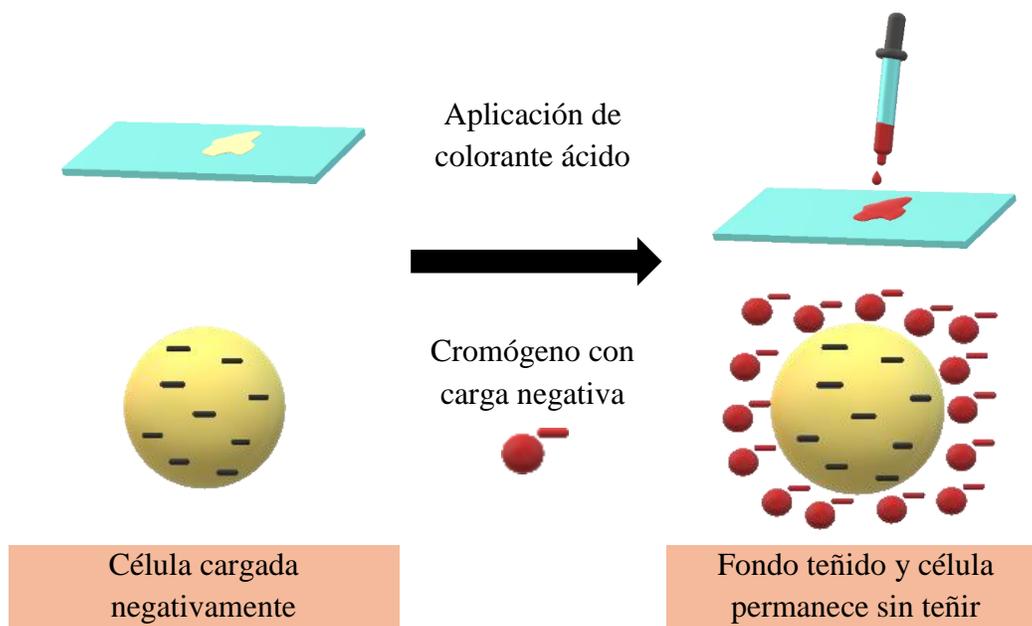
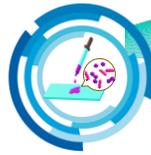


Figura 7. Tinción negativa con colorante ácido ^(modificado de 35).

2. *Colorantes básicos*: También son llamados catiónicos. Se trata de aquellos donde la carga del cromóforo es positiva. Tienen grupos cargados positivamente (normalmente alguna forma de nitrógeno pentavalente) y se comercializan normalmente como sales de cloruro. Los colorantes básicos se unen a moléculas cargadas negativamente como ácidos nucleicos, muchas proteínas y la superficie de células procariontas. Estos colorantes tiñen estructuras que son ácidas o ligeramente ácidas, es decir, cargadas negativamente. En este grupo de colorantes se encuentran los derivados del trifenil metano como la fucsina básica, cristal



violeta o violeta de genciana, así como los derivados de tiacinas como azul de toluidina, azul de metileno o las tioninas ^(32, 34).

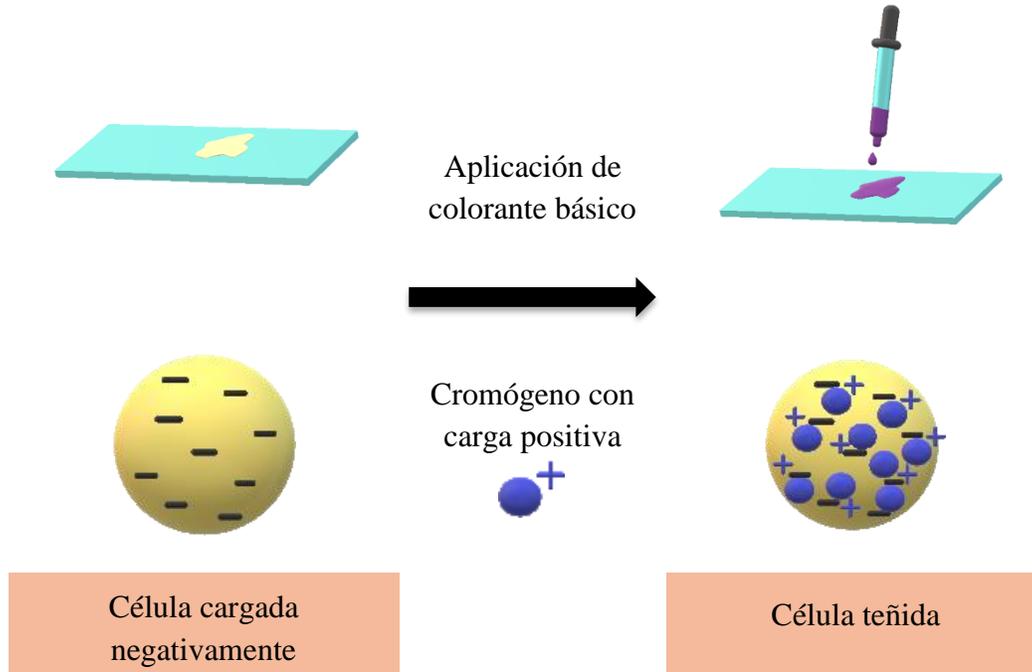


Figura 8. Tinción con colorante básico ^(Modificado de 35).

3. *Colorantes neutros*: Un colorante neutro se trata de una sal compuesta de un colorante ácido y un colorante básico como por ejemplo, el eosinato azul de metileno que en general posee las propiedades de colorantes ácidos y básicos ⁽³⁴⁾.

4. *Colorantes indiferentes*: Son colorantes insolubles en agua y solubles en alcohol donde no predomina ni la carga positiva ni la carga negativa, pero tampoco tiene un carácter neutro. En este grupo de colorantes se encuentran los colorantes de los lípidos, como tal Sudán II, Negro Sudán, entre otros ⁽³⁴⁾.

El pH puede modificar la eficacia de tinción de los colorantes ionizables, ya que la naturaleza y la cantidad de cargas en los componentes molares varían con el pH. En consecuencia, los colorantes ácidos tiñen bajo condiciones ácidas en las que las proteínas y muchas otras moléculas presentan una carga positiva, y los colorantes básicos son eficaces a pH más elevados ⁽³²⁾.

En bacteriología, se utilizan preferentemente los colorantes artificiales básicos, debido a la gran basofilia del citoplasma bacteriano, rico en ARN. Los colorantes ácidos se utilizan



preferentemente como colorantes de contraste, y los colorantes neutros y los indiferentes para algunas coloraciones particulares ⁽³²⁾.

1.9 Mordentes

Con el fin de aumentar la intensidad de la tinción o teñirla por completo, puede ser necesario agregar un reactivo intensificador de tinción. Los mordentes pueden tener una fuerte afinidad por el sustrato como por el colorante y, por lo tanto, puede anclar un colorante a una sustancia. Los mordentes pueden clasificarse como ⁽³³⁾:

1. Mordentes básicos que reaccionan con colorantes ácidos.
2. Mordentes ácidos que reaccionan con colorantes básicos.

En presencia de mordentes, los colorantes pueden ser monogénicos que muestran un color, o poligénicos, que dan varios colores con diferentes mordentes. Los mordentes se han usado con éxito con colorantes en todas las posibles secuencias de aplicación, pero variar la secuencia puede afectar los resultados obtenidos. La práctica habitual es aplicar el mordente al sustrato primero y luego el colorante ⁽³³⁾.

1.10 La tinción

Teñir supone una reacción de intercambio de iones del colorante a lugares activos de la superficie o interior de las estructuras de la célula, esto permitirá contrastar mucho más el microorganismo con respecto al medio que le rodea. Las tinciones pueden ser: simples, diferenciales o selectivas ^(34,36).

1.10.1 La naturaleza de los procesos de tinción

1.10.1.1 Tinción mediante procesos físicos

Las fuerzas físicas son sin duda, responsables de la unión entre el colorante y el sustrato ya que para este proceso es necesario asumir cambios como los de la solución y la difusión. En algunos de los casos aparentemente simples, los cambios físicos parecen completamente adecuados para explicar el proceso de tinción real. La acción de los colorantes grasos se puede explicar fácilmente en términos de propiedades de solubilidad comunes. Estos colorantes no contienen grupos fuertemente polares y se espera que se disuelvan en materiales no polares ordinarios de los tipos de lípidos y “solubles en lípidos”. Cuando el disolvente del colorante y el sustrato no son completamente miscibles, se establecerá un equilibrio de partición que depende de la naturaleza del sustrato y disolvente del colorante. En general, si la similitud en la polaridad entre el colorante y el sustrato es mayor que entre el colorante y su disolvente, la concentración del colorante será mayor en el sustrato. El agua, además de ser disolvente pobre, puede ser importante para transferir el colorante a través de



estructuras externas que contienen agua. Otra posibilidad que involucra una verdadera solución podría ser la formación de soluciones sólidas. Este tipo de sistema depende de la dispersión uniforme a nivel molecular de un sólido en otro. Específicamente, el colorante sólido, y la concentración del colorante dependerá solo de un coeficiente de distribución ⁽³³⁾.

Presumiblemente, se requeriría algún mecanismo de fijación para mantener el colorante en posición si son compatibles con tales sistemas sujetos a lavado después de que se haya aplicado el colorante. En ciertos casos, la tinción podría explicarse por el atrapamiento de cristales de baja solubilidad ⁽³³⁾.

Un ejemplo de lo anterior es la coloración de las grasas o lípidos, ya que es una tinción por adsorción; los Sudanés III o IV tiñen las grasas por la facilidad que tienen para disolverse en ellas ⁽³⁷⁾.

1.10.1.2 Tinción mediante procesos químicos

Tanto la naturaleza del sustrato como el pH influyen en gran medida en la absorción de los colorantes. Los colorantes básicos se absorben más eficazmente en soluciones alcalinas y con menos eficacia en soluciones ácidas. Por el contrario, los colorantes ácidos se absorben con menos fuerza en soluciones alcalinas y con mayor fuerza en soluciones ácidas. Esto indica la necesidad de conocer y controlar el pH en la tinción ⁽³³⁾.

Por supuesto, a medida que aumenta la alcalinidad de una solución de colorante básico y la acidez de una solución de colorante ácido, no siempre habrá un aumento indefinido en la absorción del colorante. Por una parte, hay que recordar que bajo extremos de pH se formará una cantidad creciente del color del colorante ya sea básico o ácido. Si estas estructuras son inestables o insolubles, como lo son muchas de ellas, la resistencia de la solución del colorante disminuirá y la intensidad de la tinción se perderá. Además, los aniones (fuertemente adsorbidos) aumentan y los cationes (fuertemente adsorbidos) disminuyen la cantidad captada de un colorante básico por un sustrato. La captación de colorante ácido es favorecida por cationes fuertemente y disminuye por aniones fuertemente adsorbidos. De estos hechos, el mecanismo de tinción parece depender en parte de la ionización del colorante ⁽³³⁾.

Ya sea que las fuerzas involucradas sean de naturaleza física o química, las posibilidades más destacadas son estas ⁽³³⁾:

a.) El colorante se adsorbe y mantiene en la superficie del sustrato mediante fuerzas de Van der Waals, los dipolos inducidos o enlaces de hidrógeno.



- b.) El colorante se mantiene mediante la atracción Coulombica de los iones del colorante a una superficie de carga opuesta. Las superficies cargadas de los sustratos atraen preferentemente iones de carga opuesta, y se forma una capa delgada de concentración relativamente alta.
- c.) El colorante forma un enlace salino con iones de sustrato de carga opuesta. Cualquier producto químico de este tipo debe ser insoluble para resistir el lavado.
- d.) El colorante reacciona con el sustrato para formar un compuesto covalente nuevo e insoluble.

Un ejemplo de lo anterior descrito, es el hecho de la casi imposibilidad de separar completamente el colorante de los componentes en donde ejerció su acción de tinción aun empleando sus líquidos solventes ⁽³⁷⁾.

1.10.1.3 Base química de la tinción

Los montajes húmedos simples, que consisten en una gota de solución salina, permiten la determinación de la composición celular, la morfología y la motilidad. Sin embargo, el material celular y los organismos generalmente son transparentes y se distinguen mejor por el uso de tintes o colorantes biológicos. Antonie van Leeuwenhoek fue el primero en intentar la diferenciación de bacterias con el uso de agentes coloreados naturales como jugo de remolacha en 1719 ⁽¹²⁾.

La metacromasia es un cambio de color característico que se manifiesta por los colorantes naturales (colorantes de anilina o de producción natural) cuando se unen a ciertas sustancias en el tejido o en una solución acuosa. Con la excepción de la hematoxilina, los colorantes naturales han sido reemplazados por colorantes artificiales ⁽¹²⁾.

Los grupos químicos, el cromóforo y auxocromo, completan el componente del colorante. Los grupos cromóforos son los grupos de átomos dentro de una molécula de colorante responsable de su color. El benceno, un compuesto orgánico aromático, experimenta reacciones de sustitución con radicales para formar nuevos compuestos que constituyen el sistema de resonancia del colorante. Algunos de los cambios moleculares resultan en la molécula responsable de su color. Cuanto mayor sea el número de cromóforos en un compuesto, más profundo será el color del compuesto. El benceno más que un grupo cromóforo es un cromógeno. A pesar de que el cromógeno es coloreado y típicamente iónico, no tienen una gran afinidad por las bacterias o los tejidos, y el lavado o un proceso de retención mecánica removerá fácilmente el compuesto. Por lo tanto, este grupo no constituye en sí mismo un colorante. La molécula también debe poseer un grupo ionizante llamado auxocromo, que permite que la molécula del colorante como unidad tenga afinidad. El grupo



auxocromo le otorga al compuesto la propiedad de disociación electrostática o la capacidad de formar enlaces salinos con los radicales ionizables en proteínas, glicoproteínas y lipoproteínas en componentes celulares de tejidos u organismos ⁽¹²⁾.

Algunos colorantes tienen más de un auxocromo, incluso en combinaciones con auxócromos básicos y ácidos, la carga negativa predomina normalmente ⁽¹²⁾.

Los colorantes se venden generalmente como sales, por lo tanto, es el grupo auxocromo el que generalmente determina si un colorante se clasifica como catiónico (básico) o aniónico (ácido). La mayoría de los colorantes conservarán la estabilidad de la sustancia y las propiedades catiónicas o aniónicas en todo el pH y, por lo tanto, teñir de manera confiable aquellas estructuras retenidas que están cargadas de manera opuesta ⁽¹²⁾.

1.10.2 Realización de la tinción

Para obtener una buena tinción, independientemente de cuál se esté realizando, es necesario seguir adecuadamente una serie de pasos:

1.10.2.1 Preparación de muestras

Aunque los microorganismos vivos se pueden examinar directamente con un microscopio óptico, a menudo se tienen que fijar y teñir para facilitar su observación, acentuar características morfológicas específicas, y conservarlos para estudios futuros ⁽³³⁾.

1.10.2.1.1 Extensión de la muestra

Puede prepararse a partir de productos líquidos o sólidos ^(30, 36):

-Producto sólido: Para la preparación del extendido en el caso de microorganismos procedentes de cultivos sólidos, puede emplearse un asa estéril o la propia asa de siembra para transferir una pequeña cantidad del cultivo a la superficie del portaobjetos. También puede prepararse una suspensión del material en una gota de agua o solución salina colocada previamente en el portaobjetos, extendiéndola con ayuda del asa.

-Producto líquido: En el caso de microorganismos procedentes de cultivos líquidos, puede depositarse directamente con pipeta una microgota del medio líquido o introducir cuidadosamente el asa de siembra en el medio líquido y depositar en el portaobjetos el líquido que queda adherido.

1.10.2.1.2 Secado

Se dejará secar el extendido a temperatura ambiente, hasta comprobar, por el cambio de aspecto de la preparación, que ésta se ha secado ⁽³⁰⁾.



1.10.2.1.3 Fijación

Las células teñidas que se observan con un microscopio deben parecerse lo más posible a las células vivas. Dicho lo anterior, la fijación es el proceso por el cual se conservan y fijan en su posición las estructuras internas y externas de las células de los microorganismos. La fijación tiene como objeto la inmovilización de las estructuras del material a estudiar en un estado lo más próximo posible al estado vivo y esta consiste en una muerte rápida de los microorganismos, debida a la coagulación de albúminas protoplasmáticas. En general, provoca un despliegue de proteínas globulares con un aumento en la exposición de grupos reactivos (principalmente carboxilo, amino, sulfhidrilo). Por lo tanto, el material fijo puede exhibir tanto una mayor capacidad de tinción como un aumento de la actividad reductora, además se puede usar para cambiar la afinidad por los colorantes. Inactiva enzimas que podrían alterar la morfología celular y endurece las estructuras celulares, de manera que no cambian durante la tinción ni la observación. Además de todo lo anteriormente mencionado es una medida de seguridad útil y necesaria ya que las bacterias vivas son generalmente impermeables a muchos de los colorantes utilizados ^(30, 32, 34,38).

Existe un gran número de fijadores, tanto en forma simple (etanol, ácido pícrico) como en forma de mezclas fijadoras. Las formas más habituales de fijación son ^(30, 32, 34,39):

- a.) *Calor*: La fijación por calor preserva la morfología global pero no las estructuras intracelulares. Se pasará, varias veces, la parte inferior de la preparación por la llama azul de un mechero Bunsen hasta que se note caliente al colocarlo en el dorso de la mano, pero sin que queme. Es importante mencionar que la fijación por medio de calor ha sido sobreevaluada en su capacidad para matar bacterias y no hace que las preparaciones de patógenos virulentos sean inocuas para el laboratorista susceptible.
- b.) *Química*: La fijación química se utiliza para proteger subestructuras celulares finas y la morfología de microorganismos más grandes, pero más delicados. Los indicadores químicos penetran en las células y reaccionan con los componentes celulares, normalmente proteínas y lípidos, para inactivarlos, solubilizarlos e inmovilizarlos. Se cubre la preparación con etanol o metanol, se deja actuar durante varios minutos, se oscurece y deja secar.

Cuando se fija una muestra, debe extenderse una película delgada del material que contiene los microorganismos sobre la superficie del portaobjetos. Si no se realizara la fijación el colorante podría arrastrar los microorganismos del portaobjetos cuando se realizan los lavados ⁽⁴⁰⁾.

Un buen procedimiento de fijación ^(25, 30):

- Evitará la contracción y la hinchazón de partes de la célula.
- Evita la autólisis.



- Protege las sustancias celulares que de otro modo podrían ser solubles en los reactivos de tinción.
- Hace que los materiales celulares sean más rígidos, lo cual es especialmente importante cuando se emplean secreciones o muestras biológicas muy líquidas.
- Evita la formación de artefactos. Los fijadores se eligen para cumplir con los requisitos de un procedimiento de tinción determinado o para los propósitos particulares de un estudio.

1.10.2.2 Coloración

Es el proceso de tinción de los microorganismos. Para teñirlos existe un gran número de productos químicos con propiedades colorantes. Su elección está condicionada al tipo de tinción a realizar. Utilizando generalmente colorantes básicos en soluciones hidroalcohólicas que teñirán componentes celulares ácidos ^(25, 30).

1.10.2.3 Decoloración

Es frecuente, después de una coloración someter la muestra de tinción a la subsiguiente decoloración a fin de poder diferenciar si son o no capaces de perder dichas bacterias el colorante bajo la acción de situaciones drásticas, lo que permitirá diferenciar distintos grupos bacterianos ^(25, 30).

1.10.2.4 Lavado

Es la eliminación del exceso de colorante. Para el lavado se utilizará la piseta, teniendo la precaución de no dirigir el chorro de agua directamente al frotis. Siempre entre paso y paso, en una tinción, se debe eliminar el exceso de producto ya sea colorante, mordente o decolorante, para evitar interferencias entre un producto y otro que podrían inducir a error ^(25, 30). Otra opción para realizar los lavados sin la utilización de la piseta, consiste en colocar directamente el frotis en posición vertical sobre un chorro medio de agua de la llave durante algunos segundos hasta que ya no se observe el colorante en el chorro que cae al desagüe.

1.10.2.5 Coloración de contraste

Consiste en la utilización de colorantes generalmente básicos que teñirán al final aquellas estructuras que han sido decoloradas y, que por lo tanto, no han podido ser teñidas con el colorante inicial ^(25, 30).

1.10.2.6 Observación al microscopio

Siempre se empezará por el objetivo de pocos aumentos para comprobar que la muestra está adecuadamente distribuida y no existen otros elementos, como por ejemplo cristales, restos de colorantes sin cristalizar, partículas de polvo, etc. Posteriormente se irá aumentando el objetivo ^(25, 30).



1.10.3 Aspectos prácticos

a. Utilización del asa bacteriológica

Una flama tiene 3 zonas: una zona azul interior la cual es menos caliente (cono azul claro), una zona amarilla exterior la cual es muy caliente, y una zona intermedia la cual tiene una temperatura de entre las zonas azul y amarilla ⁽⁴¹⁾.

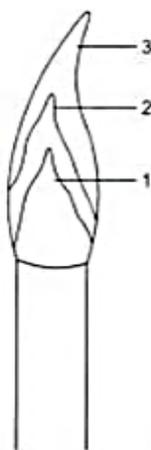


Figura 9. Zonas de la flama-dibujo (1. Menos caliente; 2. Intermedia; 3. Muy caliente) ⁽⁴¹⁾.

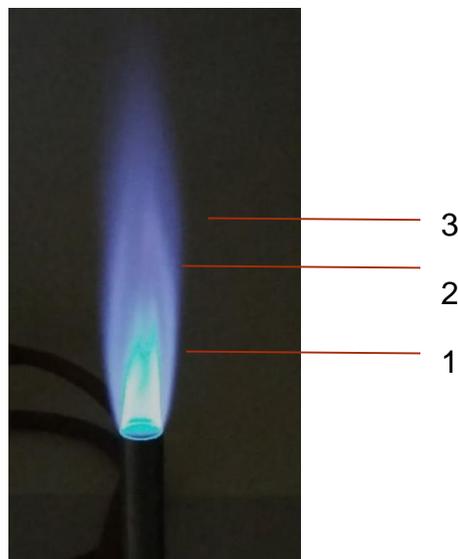


Figura 10. Zonas de la flama (1. Menos caliente; 2. Intermedia; 3. Muy caliente) *.

Las asas bacteriológicas deben flamearse antes y después de su uso, para evitar contaminar la muestra o contaminarnos con ella. Para ello, se colocan de forma vertical sobre la flama de un mechero, flameándolas en flama intermedia, hasta que se ponga al rojo vivo en toda su longitud, omitiendo el mango. Para evitar las proyecciones de partículas contaminadas, deben ser introducidas en la flama gradualmente y procurar que no estén cargadas de muestra. La zona del mango que entra dentro de los tubos también debe ser flameada. Es por ello que, para evitar algún tipo de accidente deben considerarse en todo momento los aspectos de bioseguridad, en este caso, mantener siempre la bata puesta y cubrebocas, además de lentes de seguridad por si llegara a ocurrir algún tipo de proyección inesperada ⁽⁴²⁾.

Es importante mencionar que, después de cada flameado, se dejará enfriar el asa antes de un nuevo uso con el fin de evitar la destrucción de los microorganismos o que se quemen las superficies en donde se coloca el asa ⁽⁴²⁾.

* Fotografía tomada por los autores.



-Procedimiento de flameado ⁽⁴²⁾.

El procedimiento de flameado está diseñado para calentar el extremo del asa gradualmente porque, después de su uso, contendrá cultivo, que puede "disolverse" al calentarse rápidamente con la posibilidad de liberar pequeñas partículas de cultivo y formación de aerosol.

1. Coloque el extremo del mango del asa bacteriológica en el cono azul claro de la llama (esta es la zona menos caliente)
2. Mueva el resto del asa bacteriológica lentamente hacia arriba en la región más caliente de la llama (inmediatamente por encima del cono azul claro).
3. Manténgalo allí hasta que esté al rojo vivo.
4. Asegúrese de que la longitud total del asa bacteriológica reciba un calentamiento adecuado.
5. Deje que se enfríe y use inmediatamente.
6. No coloque el bucle hacia abajo ni lo agite alrededor.
7. Vuelva a esterilizar el asa bacteriológica inmediatamente después de su uso.

b. Limpieza de los portaobjetos

La limpieza de los portaobjetos es fundamental para obtener buenas preparaciones. Una buena técnica consiste en sumergirlos, al menos 24 horas, en una mezcla de alcohol del 90° (9 partes) y ácido clorhídrico (1 parte). En el momento de su uso, se lavan con agua corriente y se secan con un paño limpio que no deje pelusas. Se considera que un portaobjetos está limpio cuando es "mojable", es decir, cuando se puede extender completamente una gota de agua sobre él ⁽⁴²⁾.

La limpieza también puede hacerse por inmersión en mezcla sulfocrómica y posterior aclarado en agua destilada. El secado puede hacerse en la estufa, evitando así las pelusas que pueden dejar los trapos ⁽⁴²⁾.

c. Utilización de la campana de seguridad

Es conveniente que el frotis realizado a partir de material clínico fresco se prepare en la campana de seguridad, ya que la emulsión del material sobre la superficie del portaobjetos con frecuencia origina aerosoles ⁽⁴²⁾.



2. Medidas de bioseguridad y manejo del RPBI

Las normas de bioseguridad para el laboratorio son reglas básicas de comportamiento destinadas a prevenir factores de riesgo laborales procedentes de agentes biológicos, físicos o químicos. El personal de los laboratorios debe incorporar estas normas en todos los procesos que se realicen en el laboratorio que lo pongan en contacto con algún tipo de reactivo, microorganismo o sustancia que pueda ser nocivo para la salud ⁽⁴³⁾.

Los principios de bioseguridad son universales: aplican a todo el personal del laboratorio. Implican la utilización de barreras físicas que se interpongan al contacto directo con materiales potencialmente nocivos a la salud, mediante el empleo de guantes, cubrebocas, lentes de seguridad, mascarillas de plástico, etc. Comprenden el conjunto de dispositivos y procedimientos para la eliminación segura de material químico tóxico y material biológico contaminante ⁽⁴³⁾.

2.1 Normas generales de bioseguridad en el laboratorio ⁽⁴³⁾

1. Reconocer que la salud del personal es lo más importante.
2. Limpiar y desinfectar las superficies de trabajo al iniciar y finalizar la jornada de trabajo.
3. Está prohibido comer, beber, fumar y/o almacenar comida dentro del área de trabajo.
4. Mantener el cabello corto o recogido.
5. No pipetear sustancia alguna con la boca. En lugar de ello utilizar peras de plástico o pipetas automáticas.
6. Los tubos que se introduzcan a la centrífuga deben ir tapados; no se debe detener manualmente la centrífuga ni destaparla antes de que cese de girar.
7. Evitar contacto con agujas y elementos corto-punzantes.
8. No permitir la entrada de personas ajenas al laboratorio y/o que no tengan sus implementos de bioseguridad adecuados.
9. Cualquier accidente, por pequeño que sea debe comunicarse al responsable del laboratorio.
10. Todos los desechos biológicos, ya sean líquidos o sólidos, tienen que ser descontaminados por el personal del laboratorio antes de su recolección y eliminación por personal especializado.
11. Todos los desechos químicos tóxicos deben almacenarse en contenedores debidamente etiquetados y mantenidos en un lugar especificado del laboratorio, mientras son removidos del área por personal especializado.



2.2 Manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos

La NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo, establece la clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos, así como las especificaciones para su manejo. Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria para los establecimientos que generen residuos peligrosos biológico-infecciosos y los prestadores de servicios a terceros que tengan relación directa con los mismos ⁽⁴⁴⁾.

Los generadores y prestadores de servicios, además de cumplir con las disposiciones legales aplicables, deben cumplir con las disposiciones correspondientes a las siguientes fases de manejo, según el caso ⁽⁴⁴⁾:

- a) Identificación de los residuos.
- b) Envasado de los residuos generados.
- c) Almacenamiento temporal.
- d) Recolección y transporte externo.
- e) Tratamiento.
- f) Disposición final.

- Identificación y envasado

En las áreas de generación de los establecimientos generadores, se deberán separar y envasar todos los residuos peligrosos biológico-infecciosos, de acuerdo con sus características físicas y biológicas infecciosas, conforme al siguiente cuadro presente en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Durante el envasado, los residuos peligrosos biológico-infecciosos no deberán mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o peligrosos ⁽⁴⁴⁾, para lo cual es importante conocer su símbolo universal, el cual se muestra en la figura 9.



Figura 9. Símbolo universal de riesgo biológico ⁽⁴⁴⁾.



Tipo de residuos	Estado físico	Envasado	Color
Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
Residuos no analíticos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo

Cuadro 3. Tipos de Residuos Peligrosos Biológicos-Infecciosos y su envasado ⁽⁴⁴⁾.

Las bolsas tienen que estar elaboradas de polietileno de color rojo translúcido de calibre mínimo 200 y las bolsas de color amarillo translúcido deben tener un calibre mínimo 300, además de ser impermeables y con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón, libres de cloro. De igual forma, tienen que estar marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda “Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos” ⁽⁴⁴⁾.

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos tienen que ser tratados por métodos físicos y/o químicos que garanticen la eliminación total de microorganismos patógenos y deben hacerse irreconocibles para su disposición final en los sitios autorizados ⁽⁴⁴⁾.

A continuación, se muestra una imagen (figura 10) que presenta los contenedores empleados en el laboratorio para el manejo de RPBI (bolsa roja y amarilla, contenedor de plástico rígido rojo y amarillo en diferentes tamaños y presentaciones), cuyo uso ya ha sido explicado en el cuadro 1.



Figura 10. Principales contenedores empleados para el almacenamiento de Residuos Peligrosos Biológicos-Infecciosos (RPBI) ⁽⁴⁵⁾.



3. Metodología

3.1 Fase pre-analítica

3.1.1 Indicaciones y precauciones generales

Al realizar cada tinción es necesario contar previamente con las condiciones necesarias para su correcta realización, para ello se deben de considerar los siguientes puntos:

- Utilizar el equipo de protección adecuado y completo para el individuo (figura 11 y 12); bata, zapatos cerrados, guantes de nitrilo o látex, cubrebocas y lentes de protección en caso de que sean necesarias. Además, mantener el cabello recogido en el caso de tenerlo largo (figura 13).



Figura 11. Equipo de protección (guantes, bata y cubrebocas) *.



Figura 12. Calzado cerrado necesario como equipo de protección *.

* Fotografía tomada por los autores.

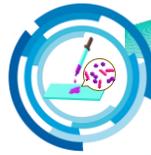


Figura 13. Cabello recogido como medida de seguridad en el laboratorio *.

- Limpiar adecuadamente la zona de trabajo con solución desinfectante (hipoclorito de sodio al 5%, alcohol al 70% o benzal), para lo cual es práctico tenerlo en un atomizador, tal como se observa en la figura 14.

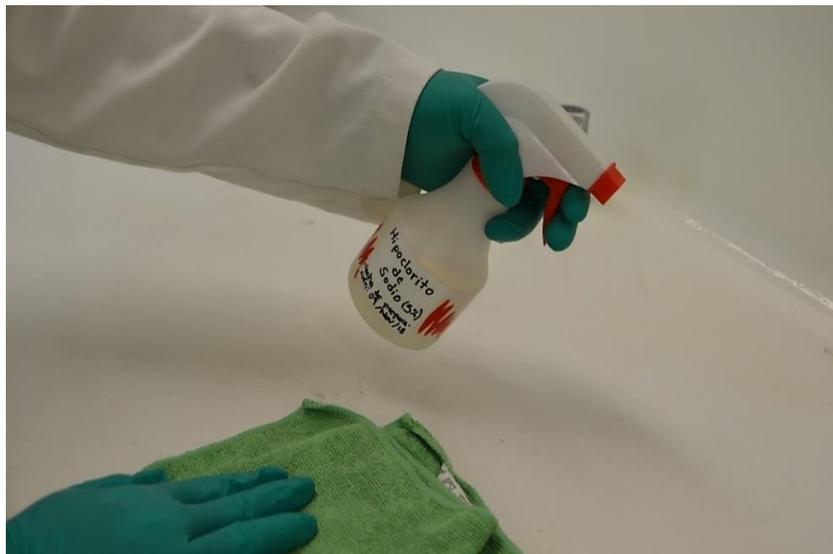
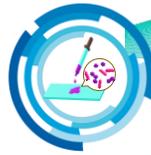


Figura 15. Limpieza de la zona de trabajo con solución desinfectante *.

* Fotografía tomada por los autores.



- Contar con el material necesario para cada tinción a realizar, mismo que se especifica más adelante en cada uno de ellas (figura 16).



Figura 16. Material necesario para realizar una tinción *.

- Asegurarse de contar con los reactivos necesarios y que se encuentren en condiciones óptimas para su uso (figura 17), por ejemplo, que no se encuentren precipitados (figura 18 y 19).

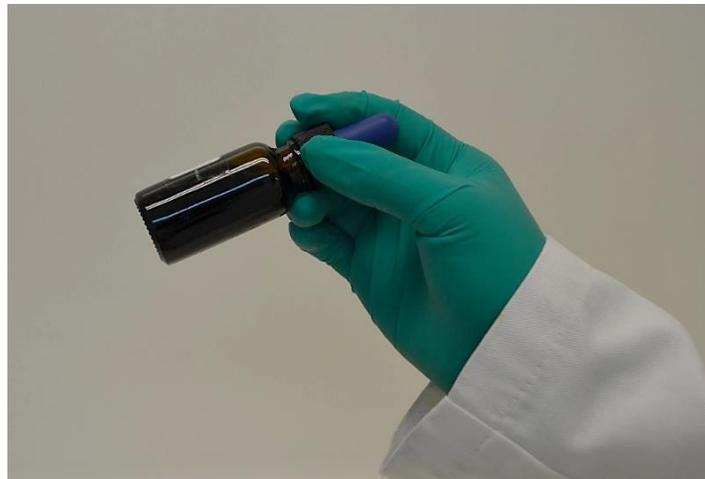


Figura 17. Revisión de las condiciones de los reactivos a emplear *.

* Fotografía tomada por los autores.

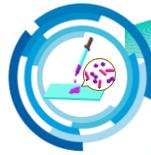
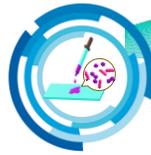


Figura 18. Reactivo de lugol en malas condiciones (precipitado) *.



Figura 19. Reactivo de rojo Congo en buenas condiciones (sin precipitar) *.

* Fotografía tomada por los autores.



- Atemperar las cepas después de sacarlas del refrigerador (alrededor de 15 o 20 min.) para su posterior uso (figura 20 y 21).

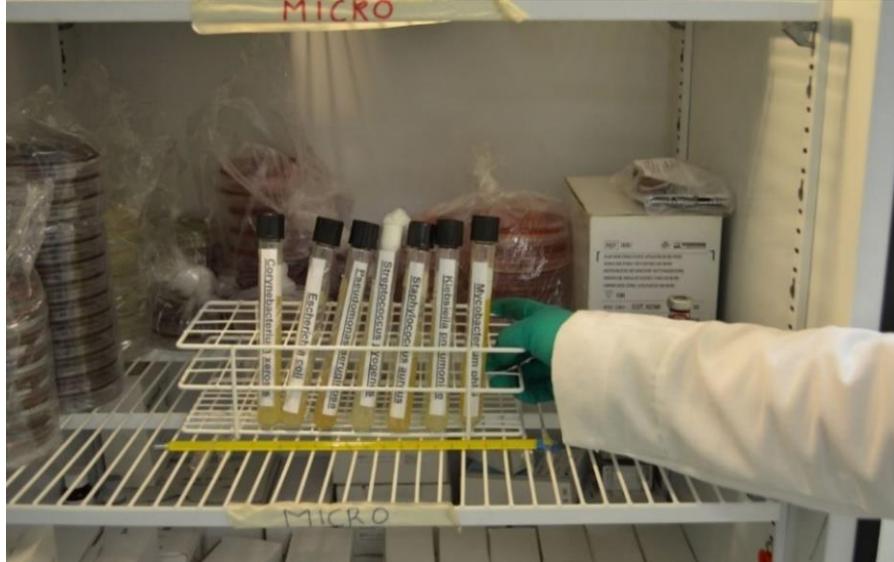


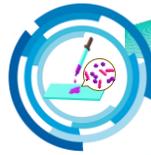
Figura 20. Sacando cepas de refrigeración *.



Figura 21. Atemperación de cepas *.

- Asegurarse de que todos los reactivos y cepas a emplear se encuentren debidamente etiquetados. La etiqueta de los reactivos deberá contener como elementos básicos el

* Fotografía tomada por los autores.



nombre del laboratorio o materia, el nombre de la solución reactivo que contiene el frasco y la fecha de preparación (figura 22). La etiqueta de las cepas debe tener su nombre correctamente escrito, es decir, género y especie y en letras cursivas o subrayado (figura 23). No usar el reactivo o cepa si no está etiquetado y no existe seguridad de que realmente sean los que se requieren.



Figura 22. Reactivos a emplear correctamente etiquetados *.

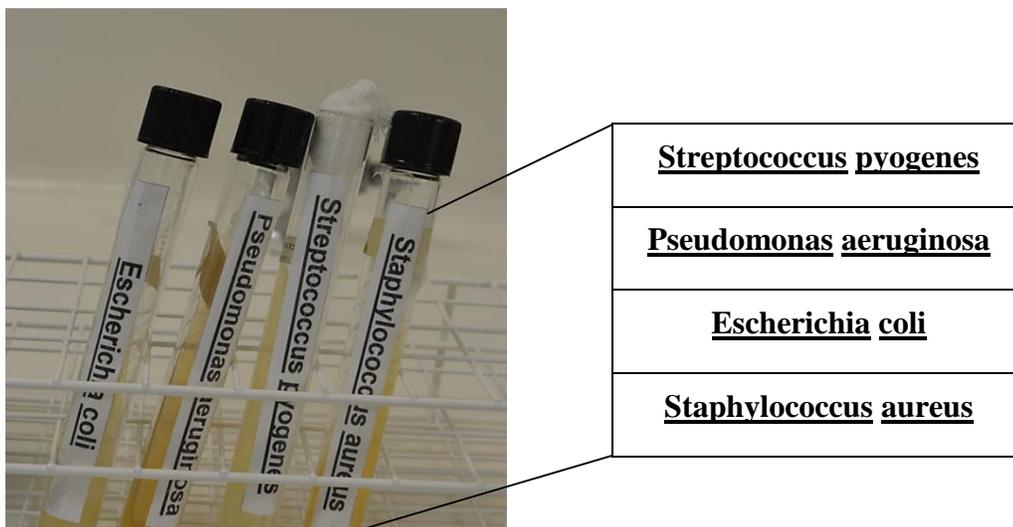
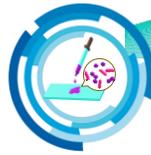


Figura 23. Cepas a emplear etiquetadas *.

* Fotografía tomada por los autores.



- Siempre considerar el tiempo indicado para realizar la tinción, tomando en cuenta que se debe trabajar eficientemente y con el debido cuidado, colocando cada reactivo de acuerdo a lo especificado en cada tinción (figura 24), además de tomar en cuenta que los portaobjetos a utilizar deben estar debidamente limpios, libres de grasa y secos, antes de comenzar con cualquier tinción (preferentemente utilizar portaobjetos nuevos).



Figura 24. Realización de la tinción *.

- Al final de cada tinción inactivar los portaobjetos en un contenedor debidamente etiquetado con solución de hipoclorito de sodio al 5%, como el que se muestra en la figura 25.

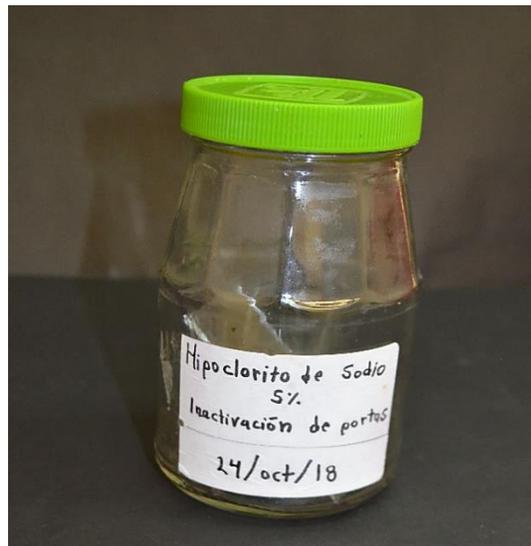


Figura 25. Contenedor para inactivación *.

* Fotografía tomada por los autores.



- Se debe contar con los contenedores para los Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI) generados en las técnicas de tinción (figuras 26).



Figura 26. Contenedor pequeño rojo de plástico rígido *.

- Además de lo anterior, se debe contar con una ruta de RPBI dentro de las instalaciones, para lo cual es necesario colocar los letreros correspondientes que la indiquen a lo largo de ésta (figura 27).

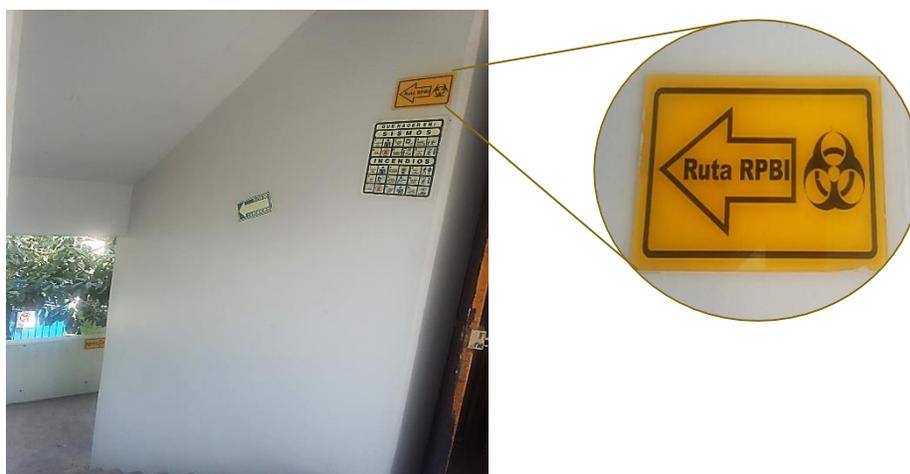


Figura 27. Ruta RPBI trazada *.

* Fotografía tomada por los autores.



- Es muy importante que para todas las tinciones se realice correctamente la aplicación de la microgota, para evitar que la muestra quede muy diluida o muy aglomerada, impidiendo con ello realizar una correcta observación de la muestra. Para ello, se muestra a continuación, en la figura 28, la correcta aplicación de la microgota, así como los posibles errores que se pueden cometer durante su colocación.

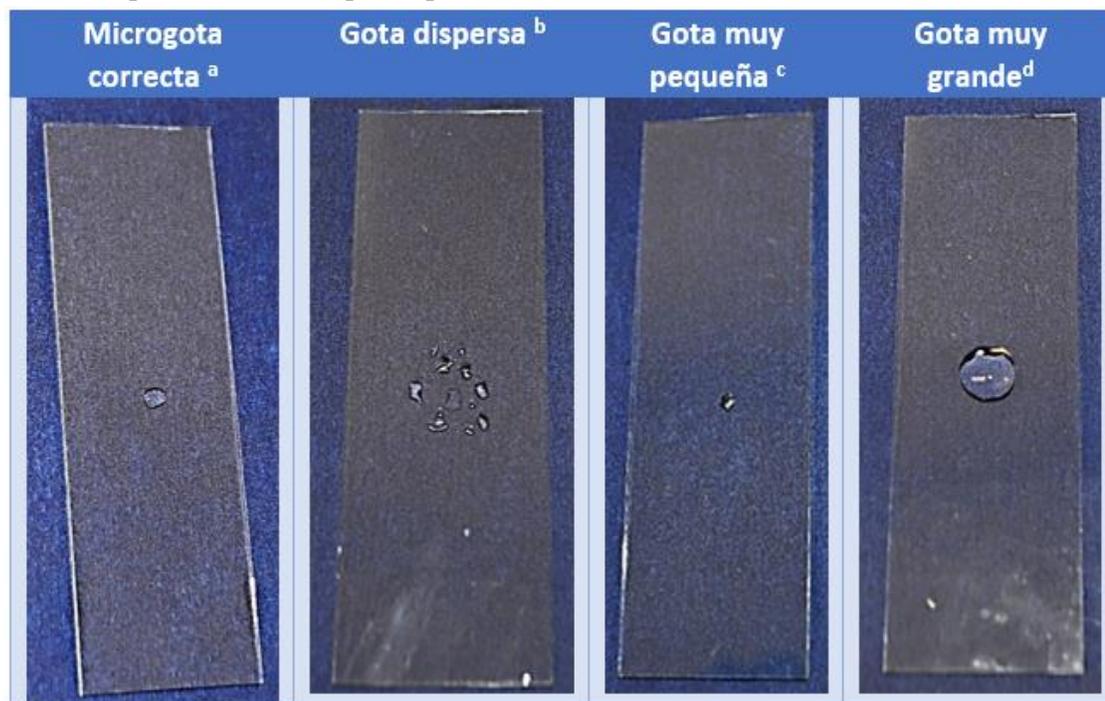
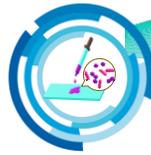


Figura 28. Aplicación de microgota en el portaobjetos y los posibles errores que se pueden presentar *.

- a. Microgota y microasada con la cantidad adecuada para realizar una tinción.
- b. Dispersión causada por grasa o suciedad en los portaobjetos, por ello es necesario que estén debidamente limpios y libres de grasa.
- c. Con la aplicación de una gota muy pequeña se corre el riesgo de que ésta se seque muy rápido antes de hacer la extensión con la cepa y que la cantidad sea insuficiente para una correcta tinción, pudiendo quedar muy aglomerada la muestra a observar.
- d. Con la aplicación de una gota muy grande se corre el riesgo de que ésta se seque muy lentamente, por lo tanto, se alarga el proceso de preparación de la muestra y consecuentemente el de la tinción, además es muy probable que se obtenga una preparación muy dispersa y diluida.

* Fotografía tomada por los autores.



- En cada paso de las técnicas de tinción donde se toma la muestra con el asa será necesario flamear en el mechero Bunsen la boquilla del tubo que contiene la cepa, pasándolo de dos a tres veces sobre la flama y realizándolo al abrir y al cerrar el tubo, como se muestra en la figura 29.



Figura 29. Flameado de la boquilla del tubo *.

- Para realizar cada tinción es necesario tomar en cuenta que para todo paso que requiera el uso del asa bacteriológica (ver página 39), lo primero que debe hacerse antes de su uso es flamearla sobre el mechero, esto es, colocarla de manera vertical sobre la flama del mechero (figura 30) en la zona intermedia de la flama (figura 31) hasta que adquiera un color rojizo, es decir, hasta que se encuentre al rojo vivo. Una vez logrado esto es necesario dejar enfriar unos segundos a temperatura ambiente, fuera de la flama pero cerca del mechero (hasta 30 cm a la redonda). No se debe forzar el enfriamiento mediante agitaciones manuales del asa o algo parecido.

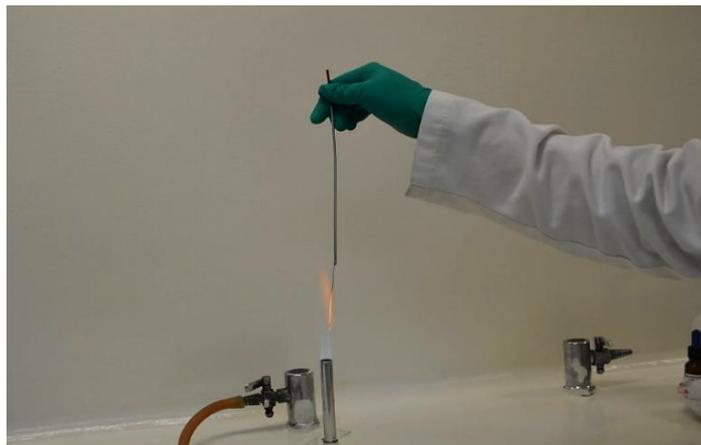


Figura 30. Uso correcto del asa bacteriológica *.

* Fotografía tomada por los autores.



- Posterior a esto, para asegurar el enfriamiento del asa, es necesario que antes de tomar la cepa contenida en el tubo, primero se coloque el asa en la superficie interior del tubo y posteriormente tocar donde comienza el medio (en la orilla del pico de flauta), como se muestra en la figura 32. Al escuchar un sonido de choque térmico del asa caliente y el medio frío significará que se terminó de enfriar el asa bacteriológica. Una vez sucedido esto, el asa ya estará lista para tomar la cepa. Este aspecto es muy importante, ya que si no se enfría el asa y se toma directamente la cepa, ésta podría dañarse, es decir, el inóculo que se está tomando se podría lisar por el calor excesivo y realmente no se colocaría algo de valor en el portaobjetos e incluso podría alterarse la morfología del microorganismo y no se apreciaría correctamente bajo el microscopio.



Figura 32. Enfriamiento del asa bacteriológica en la orilla el medio *.

- Con el asa bacteriológica previamente flameada y enfriada se toma una pequeña cantidad del cultivo o de la muestra a observar, se mezcla homogéneamente con la microgota de agua previamente colocada en el portaobjetos (si la muestra o cultivo es sólido). Para saber la cantidad adecuada de muestra a tomar, en la mayoría de los casos bastará con tocar la cepa con el asa previamente enfriada (figura 33), sin embargo, dependerá también de las características que la cepa tenga. Colocar un exceso de muestra podría generar grumos al colocarla en el portaobjetos y por lo tanto impedir que ésta se observe adecuadamente en el microscopio, debido a que los microorganismos se verán muy aglomerados y no podrán distinguirse entre sí. Por otra parte, muy poca cantidad de muestra hará que en el microscopio ésta se observe muy vacía.

* Fotografía tomada por los autores.

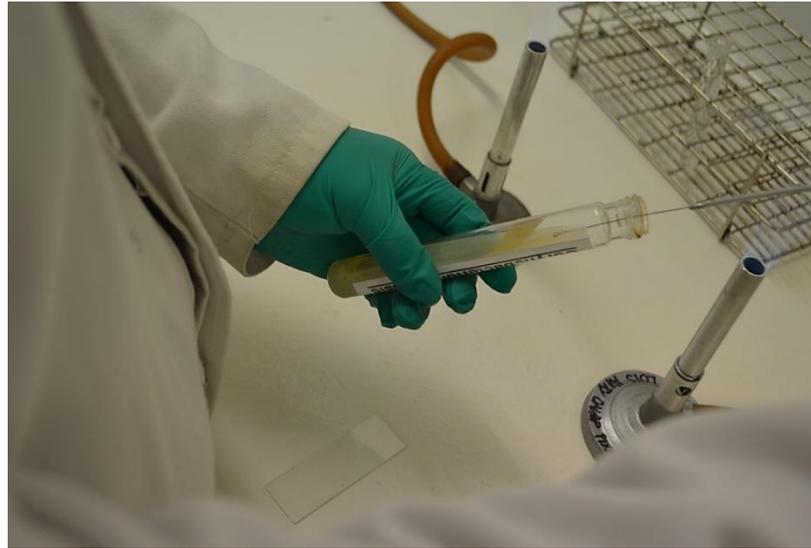


Figura 33. Tomar una cantidad de muestra adecuada *.

- Es importante asegurarse de que la homogeneización y extensión de la muestra se realice de forma uniforme y con movimientos circulares (con ayuda del asa). Posterior a esto, se debe dejar secar el portaobjetos al aire, sin agitar la preparación de forma manual. Una vez que ésta esté seca se puede continuar con la fijación la cual se explicará más detalladamente más adelante.

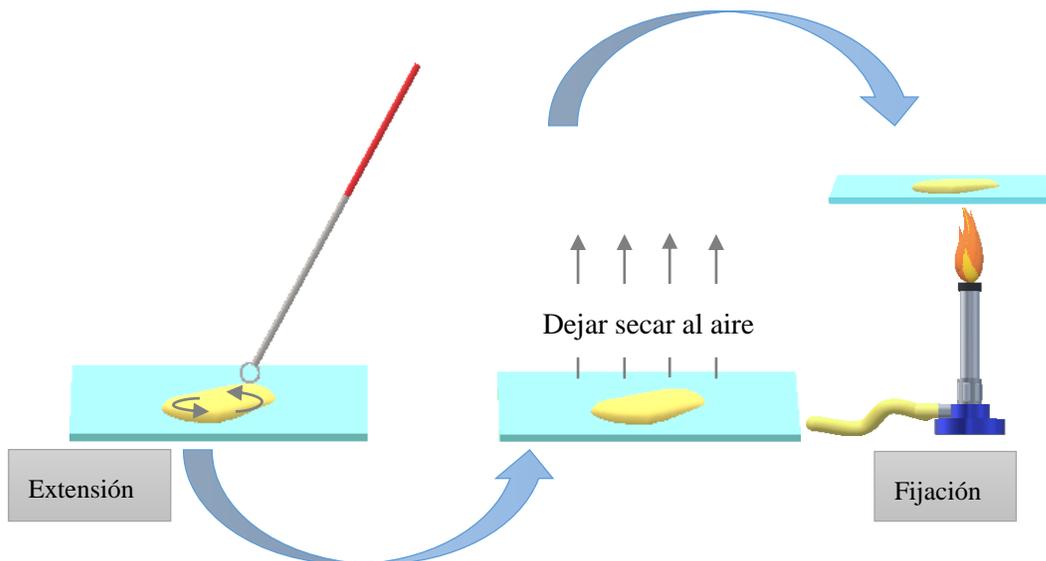
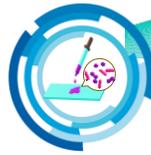


Figura 34. Proceso de preparación de la muestra.**

* Fotografía tomada por los autores.

**Esquema realizado por los autores.



- En cada tinción donde se indica “dejar secar al aire después de lavar”, se recomienda colocar el portaobjetos en una posición inclinada (lo más vertical posible) sobre alguna superficie como el puente de vidrio que se emplea para realizar tinciones o haciendo uso de la gradilla (figura 35 y 36) o sobre alguna otra superficie que lo permita, colocándose en la orilla de éste, con el fin de favorecer el secado, ya que de esta forma se permitirá que el agua escurra y se seque mucho más rápido.

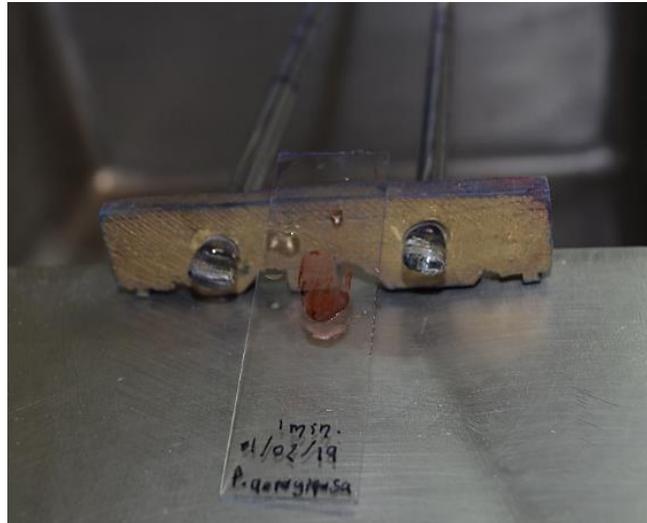
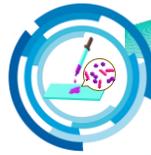


Figura 35. Secado de portaobjetos inclinado *.



Figura 36. Secado de portaobjetos vertical *.

* Fotografía tomada por los autores.



- El agregado de reactivos, así como los lavados deben realizarse en la tarja para evitar ensuciar otras áreas de trabajo (excepto si en la tinción se menciona que debe realizarse a emisión de vapores, pues ésta puede ser realizada en la mesa de trabajo del laboratorio, la cual preferentemente debe estar protegida con algún tipo de material que pueda ser retirado posteriormente, esto con el fin de mantener la limpieza de la misma). Es importante que para agregar los reactivos sobre los portaobjetos, estos estén colocados sobre un puente de vidrio o de metal (figura 37), para brindar el soporte y rigidez adecuados.



Figura 37. Realización de la tinción en una zona adecuada *.

- Es importante que en cada paso de las técnicas de tinción donde se menciona “lavar” con agua, se haga con una piseta (figura 38), con un chorro de agua fino colocándose en la parte superior del portaobjetos con el fin de que éste no caiga directamente sobre la muestra porque se corre el riesgo de afectarla o perderla en su totalidad. Como otra opción, para los lavados, estos se pueden hacer sobre un chorro fino de agua de la llave, colocando el portaobjetos de manera vertical, sin que el chorro de agua caiga directamente sobre la muestra (figura 39). El lavado en ambas formas será suficiente cuando deje de observarse color en el agua que escurre al desagüe.

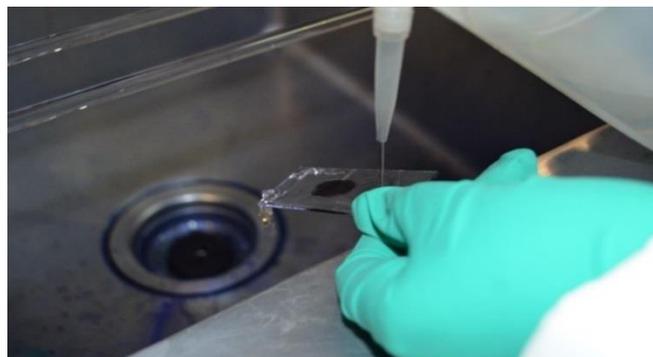


Figura 38. Lavado con piseta *.

* Fotografía tomada por los autores.

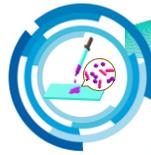


Figura 39. Lavado con chorro fino de la llave*.

- Cabe mencionar, que las indicaciones anteriores son únicamente para el manejo de cepas bacteriológicas, por lo que las indicaciones consideradas para el manejo de cepas micológicas se encuentran en la página 157. No obstante, la utilización del asa bacteriológica y micológica es la misma a excepción del tiempo de enfriamiento después de calentarla al rojo vivo, debido al mayor grosor de ésta última. Por otra parte el flameado de los tubos es el mismo para ambos casos.
- Es importante tomar en cuenta que para enfocar en el microscopio (tanto para bacterias como para hongos), primero debe realizarse comenzando con los objetivos de menor aumento (10X) (figura 40) y posteriormente realizarlo con los de mayor aumento (40X y 100X).

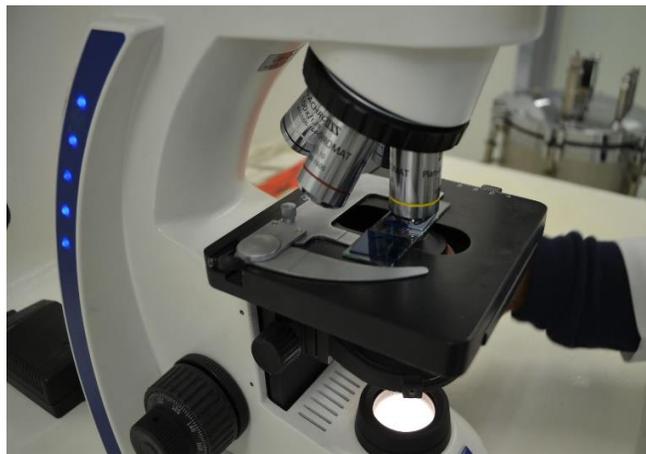


Figura 40. Observación al microscopio comenzando con objetivos de menos aumento*.

* Fotografía tomada por los autores.



3.2 Fase analítica

3.2.1 Introducción

Los colorantes son soluciones que consisten en un solvente (generalmente agua o etanol) y una molécula coloreada (obteniendo un derivado de benceno), el cromógeno. La porción del cromógeno que le da su color es el cromóforo. Un cromógeno puede tener múltiples cromóforos, y cada cromóforo asume la intensidad del color. El auxocromo es la porción cargada de un cromógeno y le permite actuar como un colorante a través de enlaces iónicos o covalentes entre el cromógeno y la célula. Los colorantes básicos (donde el auxocromo se carga positivamente como resultado de ganar un ion hidrógeno o perder un ion hidróxido) atraen las cargas negativas en la superficie de la mayoría de las células bacterianas. Así, la célula adquiere color. Estos se aplican a los frotis bacterianos que se han fijado por calor ⁽³⁵⁾.

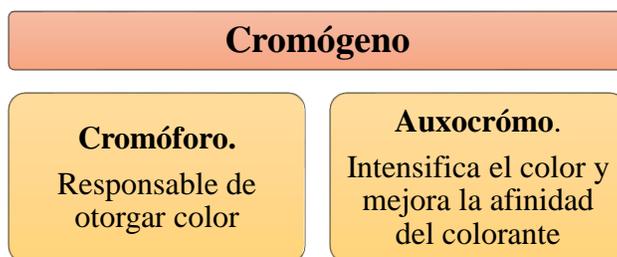


Figura 41. Componentes del cromógeno **.

Teñir supone una reacción de intercambio de iones de colorante a lugares activos de la superficie o interior de las estructuras de la célula, esto permitirá contrastar mucho más el microorganismo con respecto al medio que le rodea. Las tinciones pueden ser: simples, diferenciales o selectivas ^(25, 36).

Dos propiedades generales son necesarias antes de que cualquier sustancia sea útil como un colorante: la sustancia debe estar coloreada o lista en la tinción para obtener un producto coloreado, y algunas partes de la tinción deben conservar preferentemente el color mientras que otras partes no lo hacen. Estas dos condiciones se imponen porque el objetivo es aumentar el contraste de color en el sistema de objetos. En Bacteriología, este objetivo se logra normalmente mediante una tinción directa del microorganismo, mientras el fondo queda sin colorear. A veces es conveniente utilizar un proceso de tinción *negativa* o *de fondo* el cual tiñe el fondo y deja los microorganismos inalterados. Además de hacer que todo el microorganismo sea más visible, se han empleado colorantes para ⁽³³⁾:

** Esquema realizado por los autores.



- a. Mostrar la estructura y detalles más finos de las bacterias.
- b. Revelar la distribución y la naturaleza química de los constituyentes celulares, incluidas las enzimas.
- c. Determine el pH y los potenciales de oxidación y reducción, tanto extra como intracelularmente.
- d. Diferenciar entre organismos.

Con respecto a la visualización de los microorganismos vivos sin teñir, las técnicas de tinción poseen múltiples ventajas, entre las que destacan ⁽³⁸⁾:

- a. Proporcionar el contraste adecuado y suficiente en cada caso, lo que permitirá diferenciar distintos tipos morfológicos.
- b. Observar más adecuadamente la morfología de los microorganismos.
- c. Aportar información complementaria acerca de las estructuras internas y/o externas, mismas que no podrían ser observadas por examen en fresco.
- d. Conocer las características tintoriales para poderla incluir en alguna clasificación.

Es muy importante que las técnicas de tinción sean llevadas a cabo adecuadamente, ya que constituyen el primer paso para el estudio bacteriológico, dando paso a otras pruebas más. Sin una adecuada tinción no existirá un buen diagnóstico, por lo tanto se debe tener presente que son muchos los factores que pueden alterar los resultados obtenidos en toda técnica de tinción. Así pues, los principales factores que pueden afectarla son ⁽³⁴⁾:

1. *Pureza del colorante*: Habrá mayor error y menor calidad en la tinción cuando exista mayor grado de impurezas.
2. *Concentración del colorante*: Si existe una mayor o menor concentración de la requerida existirá error en la tinción.
3. *El pH del colorante*: Dependiendo del pH del colorante se podrá o no fijar a determinadas estructuras del microorganismo, permitiendo distinguir unos de otros.
4. *Conservación del colorante*: Deberá mantenerse siempre en un lugar fresco, seco y oscuro, correctamente envasados y etiquetados.
5. *Técnica empleada*: Se debe ser minucioso al momento de realizar una tinción, en cuanto a seguir adecuadamente los pasos que se marcan y en cuanto a otros aspectos como es el tener un adecuado material de laboratorio, que se encuentre limpio y en las condiciones adecuadas que permitan su uso sin que interfieran en la determinación.
6. *Temperatura*: Esta variará dependiendo de la tinción que se esté llevando a cabo, aunque la mayoría se lleva a cabo a temperatura ambiente, pero también existen otras en donde es necesario elevar la temperatura para permitir la entrada del colorante a las estructuras.



7. *Cantidad de muestra*: Esta debe ser representativa y homogénea, es decir, no debe ser ni muy grande ni muy pequeña porque se corre el riesgo de que no se visualice adecuadamente.
8. *Realizar correctamente la fijación de la preparación de la muestra*: Para la visualización de una muestra esta debe fijarse previamente, generalmente con calor. Esto se realiza con el fin de que los microorganismos queden fijados al portaobjetos para que al momento de adicionar los respectivos colorantes o mordentes no sean arrastrados.
9. *Soluciones mordentes*: En ocasiones es necesario agregar un reactivo que no presenta capacidad tintorial como tal pero que ayuda a que el colorante respectivo sea fijado a la estructura del microorganismo.
10. *Tiempos de tinción*: Cada reactivo que sea agregado, ya sea colorante, mordente, etc., requiere de un tiempo distinto dependiendo la tinción, por lo que deben seguirse correctamente, pudiendo ir desde algunos segundos hasta varios minutos.
11. *Calidad del colorante*: Para asegurarse de tener una adecuada calidad del colorante y por lo tanto de la técnica de tinción a realizar, deben considerarse algunos de los puntos anteriormente descritos, entre los que se incluyen la pureza del colorante, es decir, que esté libre de artefactos o cristales insolubles, de una adecuada concentración y de un correcto pH (el cual variará dependiendo del colorante del cual se trate). Por lo tanto, es importante que antes de comenzar cualquier procedimiento dentro del laboratorio se verifique el buen estado de los colorantes a emplear. Además de lo anterior, debe tomarse en cuenta que los lotes de colorantes a preparar dependerán de la demanda que se tenga dentro del laboratorio, es decir, no se deben preparar lotes demasiado grandes si el uso de los colorantes dentro del laboratorio es mínimo, debido a que con el paso del tiempo dichos colorantes tienden a precipitarse y ya no tendrán la misma calidad ⁽⁴⁶⁾.

La concentración de las soluciones de tinción puede verse afectadas debido al efecto de la evaporación de los disolventes, afectado así los resultados de las tinciones. Por lo anterior, las tinciones deben verificarse diariamente con cepas de control de calidad que presenten resultados positivos y negativos para cada tinción, con el propósito de garantizar que los reactivos están activos y en buen estado, además de que ofrecen los resultados esperados. Por ejemplo, para el control de la tinción de Gram se recomienda el uso de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ATCC.

Todos los resultados de control de calidad que se realicen deben ser registrados. Además, las tinciones también se deben analizar en búsqueda de precipitaciones o formación de cristales, de ser así es recomendable la filtración de los colorantes ⁽⁴⁷⁾.



Como se puede observar en la figura 38, se presentan de forma breve aquellos pasos que se consideran de importancia para realizar una tinción, tomando en cuenta que estos pueden variar dependiendo del tipo de tinción a realizar, omitiéndose el orden e inclusive la realización de algunos pasos como ya se verá posteriormente.

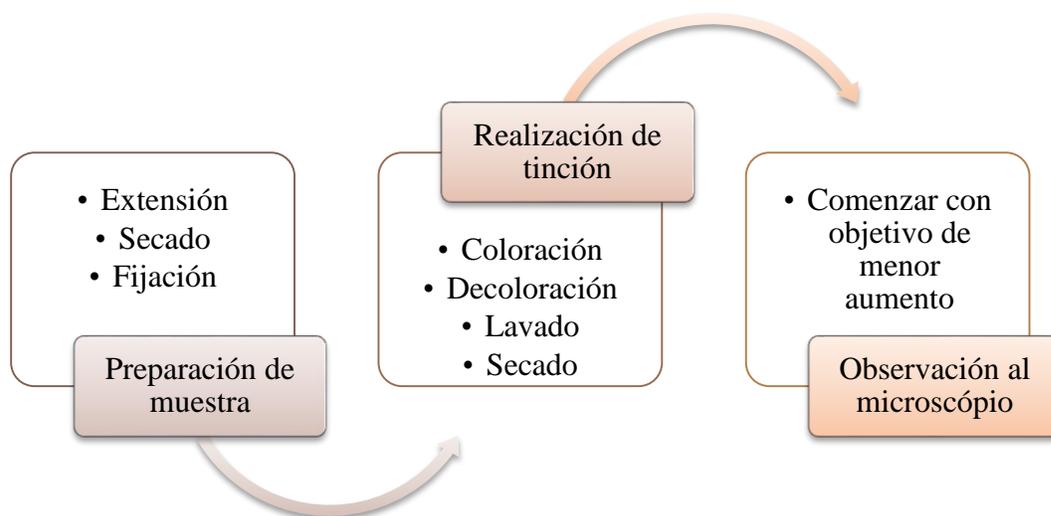


Figura 42. Pasos realizados en una tinción **.

Además de lo anterior, es importante reconocer los tipos de tinciones que pueden emplearse, para lo que se presenta el cuadro:

	Tinción simple	Tinción diferencial	Tinción estructural
Fijación	Si	Si	Si
Colorantes empleados	Un colorante	Dos colorantes	Al menos un colorante
Observación	Morfología bacteriana	Morfología y otras características	Características estructurales

Cuadro 4. Características de los tipos de tinciones (Modificado de 34).

3.2.2 Realización de las tinciones

En el siguiente cuadro sinóptico se presentan de forma breve las tinciones que se abordaran con mayor detalle a continuación:

** Esquema realizado por los autores.

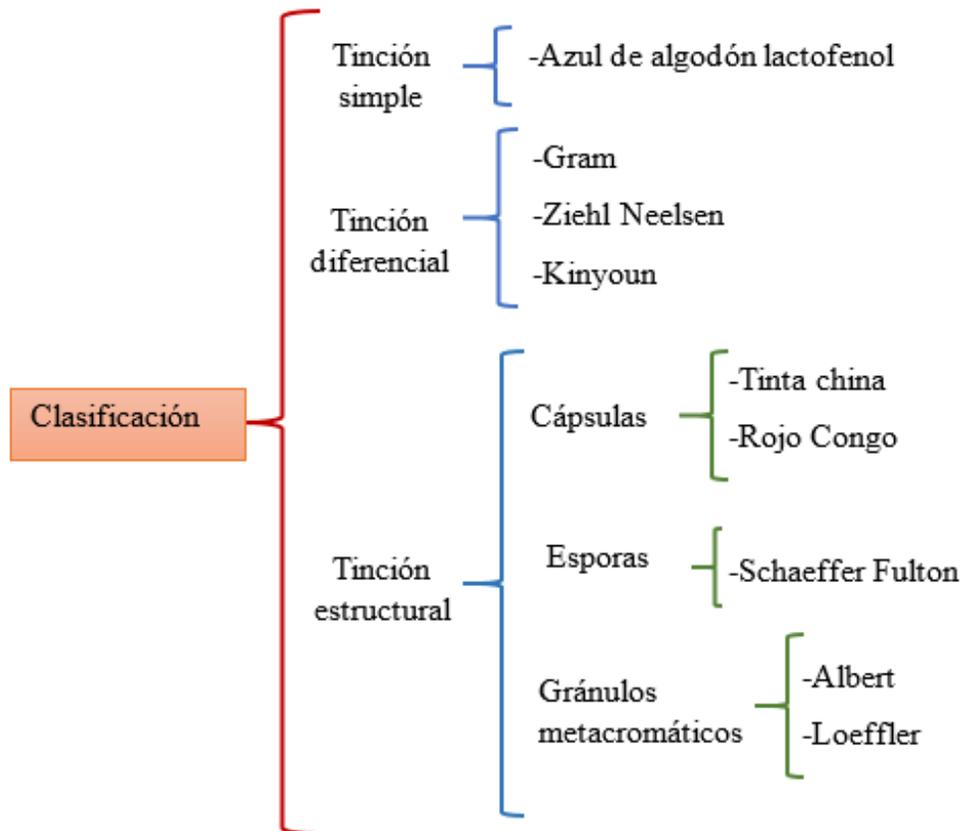
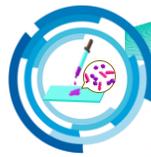


Figura 43. Ejemplos de los tipos de tinciones *.

3.2.1.1 Tinciones diferenciales

Las tinciones diferenciales son de las más utilizadas en el área de Microbiología por las amplias aplicaciones que posee para la salud. Este tipo de tinción es cuando se visualiza más de un color porque se utiliza más de un colorante y sirven para poner de manifiesto las características de afinidad por ciertos colorantes de microorganismos. Se basan en el hecho de que distintos tipos de células tienen distinta composición química, y por lo tanto reaccionan de forma diferente frente a una tinción, lo que permite clasificar los microorganismos en diferentes grupos, según su capacidad de tinción ^(32, 33,36).

* Esquema realizado por los autores.



3.2.1.1.1 Tinción de Gram

Por medio de esta tinción se divide a los microorganismos en dos grandes grupos, Gram positivos y Gram negativos, según retenga o no el cristal violeta utilizado en la tinción. Las diferencias en la composición de las paredes de las células Gram positivas, que contienen una capa gruesa de peptidoglucano con numerosos enlaces cruzados de ácido teicoico, y las paredes de las células Gram negativas, en las que la capa de peptidoglucano es más delgada, explican las diferencias de tinción de Gram entre estos dos grupos principales de bacterias. Es probable que la gran cantidad de enlaces cruzados de ácido teicoico de los microorganismos Gram positivos contribuya a su capacidad de resistir la decoloración con alcohol. Si bien el colorante de contraste puede ser captado por los microorganismos Gram positivos, su color violeta no se altera ⁽⁴⁸⁾.

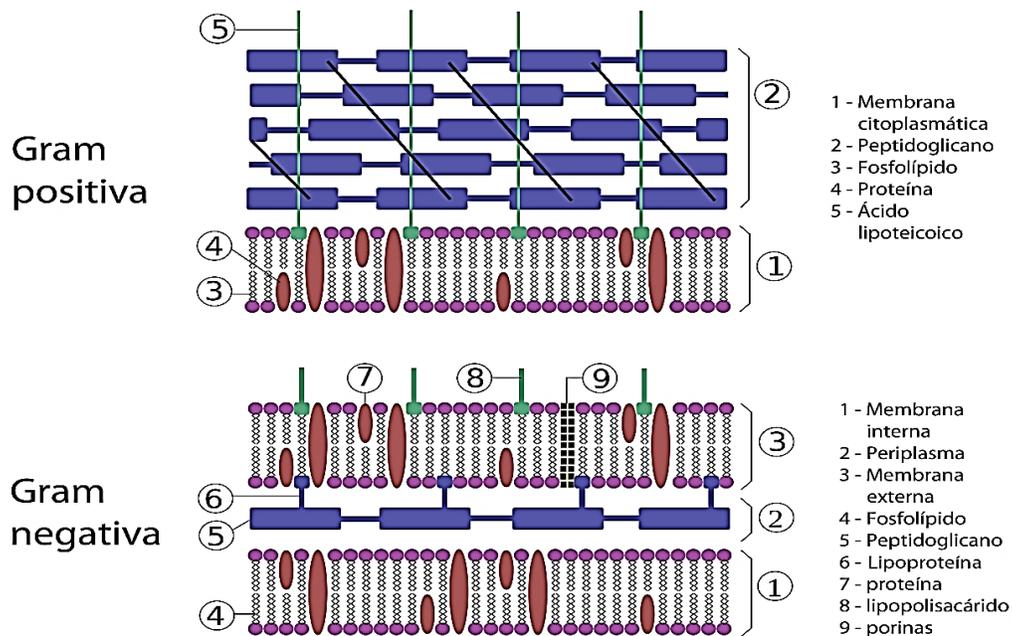


Figura 44. Esquema de las diferencias estructurales entre bacterias Gram negativas y Gram positivas ⁽³⁸⁾.

3.2.1.1.1.1 La reacción de Gram

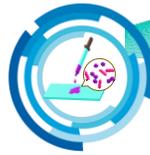
Hay mucha evidencia que indica que la localización de la reacción de Gram se encuentra en la pared celular. Si los organismos se tiñen con una solución acuosa simple de un colorante básico como la safranina, solo se tiñe el citoplasma. En este caso los organismos teñidos aparecen con espacios incoloros entre ellos, estos espacios son, por supuesto, las paredes celulares no teñidas de los organismos. Los colorantes con los que se cuenta para obtener los mejores resultados en dicha tinción son los colorantes de tetra-, penta- y hexametilparosanilina, así como el metilo de violeta y el cristal violeta. Así mismo, el yodo



es por mucho el mejor mordente, los sustitutos más satisfactorios de ser agentes oxidantes capaces de formar capas con cristal violeta. Al agregar soluciones de yodo a los colorantes recomendados, las capas de color intenso y de estructura desconocida son altamente insolubles en agua y solo son moderadamente solubles en alcoholes de bajo peso molecular. En la reacción de Gram, el yodo se debe aplicar después del colorante, ya que, si las células se exponen al mordente y luego se aplica el colorante, la decoloración será similar para los organismos Gram negativos y los Gram positivos ^(25, 33, 48).

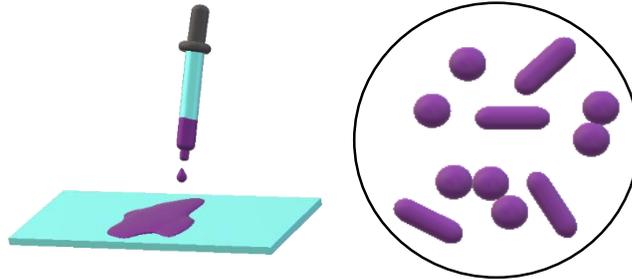
3.2.1.1.2 Fundamento de la tinción de Gram

Los principios de la tinción de Gram están basados en la composición y estructura de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. La tinción de Gram se basa en colocar como colorante primario cristal violeta, el cual se une a la pared celular bacteriana ya que tiene afinidad con el peptidoglicano de ésta. Posteriormente, se coloca lugol, el cual funciona como mordente, es decir, para la unión o fijación del colorante e impide la salida del cristal violeta de algunas especies de bacterias, incluso luego del tratamiento con un decolorante, debido a la formación de un complejo cristal violeta-lugol que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana. Posteriormente, se coloca una mezcla de alcohol acetona, la cual deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de ésta, así como también destruye la membrana externa de las bacterias Gram negativas debido a que ésta es soluble a la acción de disolventes orgánicos, como la mezcla de alcohol acetona. Las bacterias Gram positivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza este complejo, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener por tener menos cantidad de peptidoglicano en su pared. Por último, se coloca safranina, la cual funciona como colorante secundario o de contratinción y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-lugol ^(30, 49, 50).



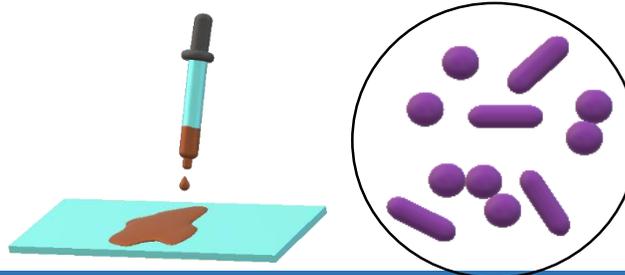
1 Colorante primario: Cristal violeta

Todas las bacterias se tiñen de color **azul-violeta**.



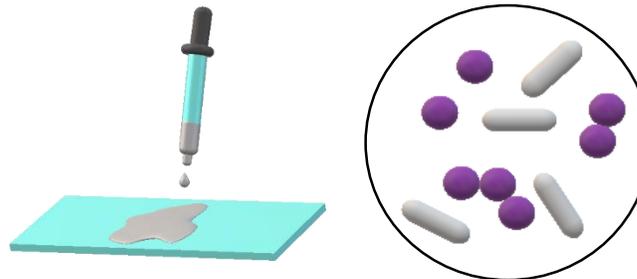
2 Mordente: Lugol

Todas las bacterias permanecen de color **azul-violeta**.



3 Decolorante: Alcohol acetona

Gram negativas: se decoloran
Gram positivas: permanecen de color **azul-violeta**.



4 Colorante de contraste: Safranina

Gram negativas: se tiñen de color **rojo-rosa**
Gram positivas: permanecen de color **azul-violeta**.

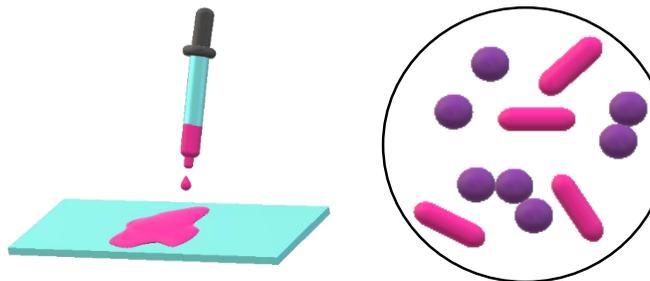


Figura 45. Esquema de la técnica de la tinción de Gram **. Nota: entre cada paso se realizan lavados con agua.

** Esquema realizado por los autores.



3.2.1.1.1.3 Variaciones de la reacción

Hay bacterias de un mismo género que pueden observarse en la misma muestra como Gram positivas y como Gram negativas, a este evento se le llama tinción Gram variable secundaria a alteración en nutrientes, temperatura, pH o concentración de electrolitos. No todas las bacterias se pueden teñir por esta técnica, ya que carecen de pared celular (micoplasma) o su pared celular tiene una composición química diferente (micobacterias, que cuentan con una gran cantidad de ácidos micólicos). Las muestras útiles para su uso son líquidos estériles, biopsias para cultivo, abscesos, hisopados, crecimiento de colonias aisladas en medios de cultivo ⁽⁴⁹⁾.

Tinción de Gram			
Referencia	Harvey RA, Champe PC	Forbes BA, Sahn D, Weissfeld A	Koneman EW, Allen SD, et al
Solución de cristal violeta	1 min	10 a 30 s	1 min
Solución de yodo	1 min	El doble de tiempo que estuvo el cristal violeta.	1 min
Alcohol acetona	5 s o dependiendo de la densidad de la muestra.	10 s, los frotis gruesos requieren más tiempo.	Hasta que no se arrastre más cristal violeta, usualmente 10 s o menos.
Safranina	30 s	30 s	1 min

Cuadro 5. Comparación de tiempos empleados para cada reactivo por diferentes autores para la tinción de Gram ^(48,50,51).

Con base en las anteriores fuentes bibliográficas citadas y de acuerdo a las características y condiciones del laboratorio que se utiliza para la materia de Bacteriología y Micología Médicas en cuanto a material y reactivos, así como también para fines de este libro, se seleccionaron los mejores tiempos para cada tinción y el procedimiento llevado a cabo se presenta a continuación con el tiempo empleado para dicha tinción.

3.2.1.1.1.4 Microorganismos empleados o de importancia

Para comprender mejor las características de los microorganismos que se emplearán para esta tinción, a continuación se mencionan algunas de los aspectos más relevantes de estos.



- *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos, son cocos Gram positivos inmóviles, aerobios facultativos que fermentan la glucosa y se distinguen por un crecimiento en racimos irregulares y por unos enlaces cruzados de pentaglicina en su peptidoglucano. La mayoría de las especies son habitantes naturales de la piel y de las mucosas de los mamíferos y no se encuentran en otros hábitats importantes ⁽¹²⁾.

Staphylococcus aureus es la única especie que fermenta el manitol en condiciones de anaerobiosis. Además *S. aureus* tiene una elevada tolerancia a la sal y crece en medios que contienen 7.5 a 10% de NaCl ⁽¹²⁾.

Los estafilococos están entre las más resistentes de todas las bacterias no formadoras de esporas. Permanecen vivos durante meses sobre la superficie de placas de agar selladas, almacenadas a 4 °C y pueden aislarse de muestras de pus desecado de muchas semanas. Algunas cepas son relativamente resistentes al calor (resisten 60 °C durante 30 min) y a la mayoría de los desinfectantes ⁽¹²⁾.

a.) Morfología

El diámetro de los cocos individuales es de 0.7 a 1.2 µm. Las células en cultivos viejos o las ingeridas por fagocitos pueden ser Gram negativas. El agrupamiento celular en racimos característico de las células es más llamativo en medios sólidos; se produce porque los estafilococos se dividen en tres planos perpendiculares consecutivos y las células hijas no se separan por completo. En medios líquidos es habitual la formación de cadenas cortas; pero al contrario que los estreptococos, los estafilococos rara vez forman cadenas de más de 4 miembros ⁽¹²⁾.

b.) Clasificación

La patogenicidad se correlaciona con la capacidad de producir coagulasa que, con la pigmentación, todos los estafilococos coagulasa positivos de origen humano se agrupan ahora bajo *S. aureus*. Los estafilococos coagulasa negativos muestran una heterogeneidad mucho mayor que los coagulasa positivos ⁽¹²⁾.

c.) Patogenia de la enfermedad invasiva

La piel y las fosas nasales de los lactantes se colonizan por *S. aureus* a los pocos días del nacimiento, después, el índice de portadores es baja, para aumentar de nuevo durante la infancia hasta llegar a un índice aproximado del 30% en la edad adulta. Los organismos se encuentran generalmente en la parte anterior de las fosas nasales y en la piel y mucosas; los estafilococos coagulasa negativos prefieren la piel, y los coagulasa positivos, las mucosas.



La colonización representa una asociación estable que conlleva una interacción específica entre adhesinas estafilocócicas y receptores celulares. Los organismos que habitan en las fosas nasales son tal vez la principal causa de las infecciones endógenas ⁽¹²⁾.

d.) Diagnóstico de laboratorio

El hallazgo de cocos Gram positivos en las extensiones teñidas de exudados purulentos proporciona sólo una información sugestiva, ya que los estafilococos no pueden ser diferenciados de otros cocos Gram positivos sólo por datos puramente morfológicos. La identificación de *S. aureus* se sospecha por la morfología colonial, la producción de pigmento, hemólisis, fermentación del manitol y crecimiento de los organismos en un medio con elevada concentración de sal; pero estas propiedades son variables, mientras que una prueba de la coagulasa positiva certifica el diagnóstico ⁽¹²⁾.

- *Streptococcus pyogenes*

Los miembros del género *Streptococcus*., son cocos Gram positivos, de tamaño relativamente pequeño (1-1.5 μm), anaeróbios facultativos, dispuestos en cadenas y pares. Muchas especies del género *Streptococcus*., son saprófitos para el ser humano, otros son oportunistas y algunos son patógenos. Estos microorganismos fueron descritos en primer lugar por Billroth en 1874, en los exudados purulentos de lesiones de erisipela y de heridas infectadas, con el tiempo denominados estreptococos, se aislaron también de la sangre de enfermos con fiebre puerperal y de la garganta de enfermos con escarlatina. Se sabe que una sola especie de estreptococos puede producir diversas enfermedades ^(25, 12,52).

a.) Clasificación

Aunque existen distintas clasificaciones para este género, las más utilizadas consisten en el estudio de ^(25, 12,52):

-Tipo de hemólisis

En 1912, Brown introdujo los términos alfa, beta y gamma para describir los 3 tipos de reacciones hemolíticas que había observado en las placas de agar sangre. Esta se basa en la capacidad para romper eritrocitos con la consiguiente producción y hemólisis alrededor de sus colonias en agar sangre.

-Caracteres antigénicos

Debido fundamentalmente a los esfuerzos de Lansenfield en el inicio de la década de 1930, los estreptococos β -hemolíticos fueron clasificados adicionalmente en varios grupos inmunológicos designados por las letras A a la S.



b.) Patogenicidad

S. pyogenes (*Streptococcus* del grupo A). En general, los estreptococos que pertenecen al grupo A son patógenos en su mayoría y van a corresponder al 90% de las infecciones estreptocócicas. Se pueden encontrar con facilidad en la mucosa nasal y faríngea de las personas enfermas y sanas. Su efecto patógeno es debido a la presencia de enzimas, toxinas y antígenos de superficie. Ocasiona tanto enfermedades supurativas como secuelas no supurativas. El primer grupo incluye la faringitis estreptocócica aguda y todas sus complicaciones purulentas. Además, produce infección uterina posparto (sepsis puerperal), celulitis dérmica, impétigo, linfangitis y erisipela. Las principales enfermedades no supuradas son la glomerulonefritis aguda y la fiebre reumática ^(25, 12,52).

- *Pseudomonas aeruginosa*

El género *Pseudomonas*, comprende bacilos Gram negativos, generalmente de pequeño tamaño (se tiñen con dificultad en la tinción de Gram), aerobios estrictos, móviles por medio de flagelos dispuestos polarmente. La mayoría de las especies son organismos inofensivos del suelo, pero algunas especies son patógenas para los humanos o los animales. Las especies que son patógenas pueden mostrar alguna adaptación al hábitat humano ^(25, 52,53).

Pseudomonas aeruginosa se asocia frecuentemente con infecciones de tracto urinario en humanos. Sin embargo, esta especie no es un parásito obligado, ya que también es común en el suelo y por lo tanto parece ser principalmente un patógeno oportunista que inicia infecciones en individuos cuya resistencia es baja. Se puede encontrar en una gran mayoría de ambientes húmedos y, en ocasiones, en la flora normal intestinal o de la piel. Los fregaderos, el equipo de asistencia respiratoria y los humidificadores de los hospitales pueden constituir importantes reservorios. La capacidad de usar moléculas orgánicas simples como fuente de energía y carbono permite la multiplicación de estos organismos en soluciones (tales como antisépticos débiles, suero salino y soluciones jabonosas) que no permitirían el crecimiento de la mayoría de bacterias. Además, los enfermos pueden infectarse sistemáticamente a partir de su propia flora normal ^(25, 52,53).

A causa de su ubicuidad, *P. aeruginosa* puede encontrarse en muestras clínicas como contaminante sin relación alguna con la enfermedad y es responsable de algunas de las infecciones más graves y mortales en individuos inmunosuprimidos. En los individuos sanos, las infecciones por *P. aeruginosa* son raras y habitualmente leves. Exhibe niveles inusualmente elevados de resistencia a muchos antibióticos; de ahí que la introducción de antibióticos de amplio espectro, que suprimen el resto de la flora, ha traído como consecuencia su aparición como importante patógeno nosocomial ^(25, 52,53).



- *Escherichia coli*

El género *Escherichia*, está constituido por bacterias Gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas, con morfología bacilar, aunque las formas jóvenes son de tipo cocobacilar, móviles. El tubo digestivo de la mayoría de los animales de sangre caliente se coloniza regularmente por *E. coli* a las pocas horas o días del nacimiento, a partir del agua o del alimento ingerido, o directamente desde otros individuos ^(12, 52).

La mayoría de las cepas de *E. coli* pueden adherirse al moco que recubre la superficie del colon y del intestino delgado distal. Normalmente esta especie es el anaerobio facultativo más común en el colon ^(12, 52).

a.) Patogenia

Los tres tipos principales de enfermedad, cada uno dependiente de un conjunto específico de determinantes patógenos, son las infecciones del tracto urinario, la meningitis neonatal y las enfermedades intestinales (diarreicas). Estas enfermedades dependen de la combinación de diversas propiedades bacterianas: adherencia a receptores específicos del hospedado, elaboración de exotoxinas específicas y penetración (invasión) de las células del hospedador. Otros factores bacterianos. Aunque no representan un papel tan directo en la patogenia de la enfermedad, contribuyen también a la virulencia de *E. coli* patógeno para producir diversas enfermedades ^(12, 52).

-Infección del tracto urinario

E. coli es responsable de casi el 90% de las infecciones producidas en las vías urinarias anatómicamente normales y sin obstrucción. Las cepas uropatógenas están presentes en las heces, desde donde colonizan de forma secundaria la vagina y la región periuretral. Esta colonización es la primera etapa para el ascenso de las bacterias a la vejiga ^(12, 52).

-Enfermedades intestinales

Existen diferentes tipos de enfermedades diarreicas causadas por *E. coli*. Pueden distinguirse cuatro clases de *E. coli* productores de enfermedad diarreica: cepas enterotoxigénicas (ECET), enteropatógenas (ECEP), enteroinvasivas (ECEI) y enterohemorrágicas, enteroadherente difusa (DAEC2). Cada clase manifiesta distintas características patógenas, clínicas y epidemiológicas. Sin embargo, tampoco debe perderse de vista que también *E. coli* se presenta de manera normal como parte de la microbiota ^(12, 52).



3.2.1.1.1.5 Procedimiento de la tinción de Gram

Material	Aparatos y equipo	Reactivos	Cepas
-Asa bacteriológica	-Microscopio	-Solución de cristal violeta	- <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12600)
-Portaobjetos	-Cronómetro	-Solución de yodo	- <i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)
-Mechero Bunsen con manguera		-Solución de alcohol acetona	- <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
-Piseta		-Safranina	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-Goteros para cada reactivo		-Aceite de inmersión	
-Encendedor		-Agua	
-Gradilla			

Cuadro 6. Material, aparatos, equipos, reactivos y cepas empleadas para la tinción de Gram.



Figura 46. Material necesario para la tinción de Gram *.



Figura 47. Aparatos y equipo a emplear en la tinción de Gram *.

* Fotografía tomada por los autores.



Figura 48. Reactivos a emplear en la tinción de Gram *.

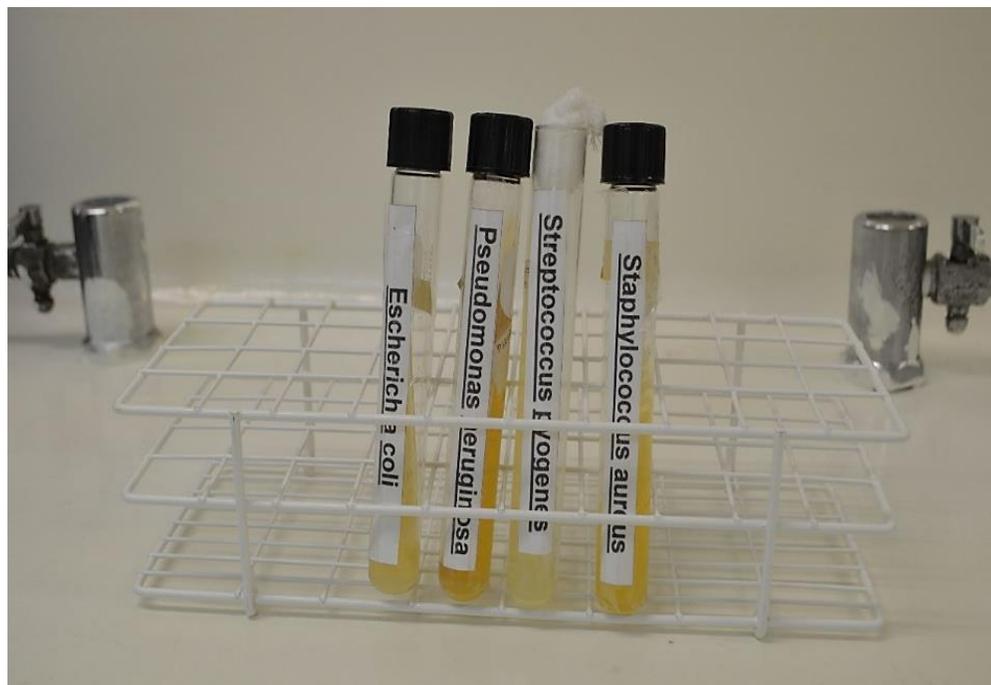
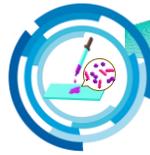


Figura 49. Cepas a emplear para la tinción de Gram *.

* Fotografía tomada por los autores.



Tinción de Gram (Modificado de 48)

Preparación de espécimen o muestra

1

Colocar en el portaobjetos una microgota de agua con ayuda del asa bacteriológica (figura 50).

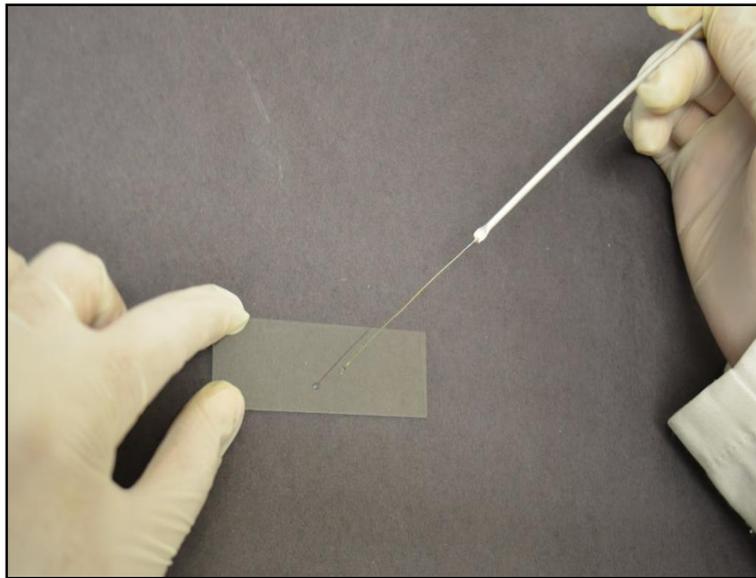


Figura 50. Colocación de microgota *.

2

Realizar una extensión con el material a estudiar (ver página 52) y homogeneizar con ayuda del asa bacteriológica (figura 51).

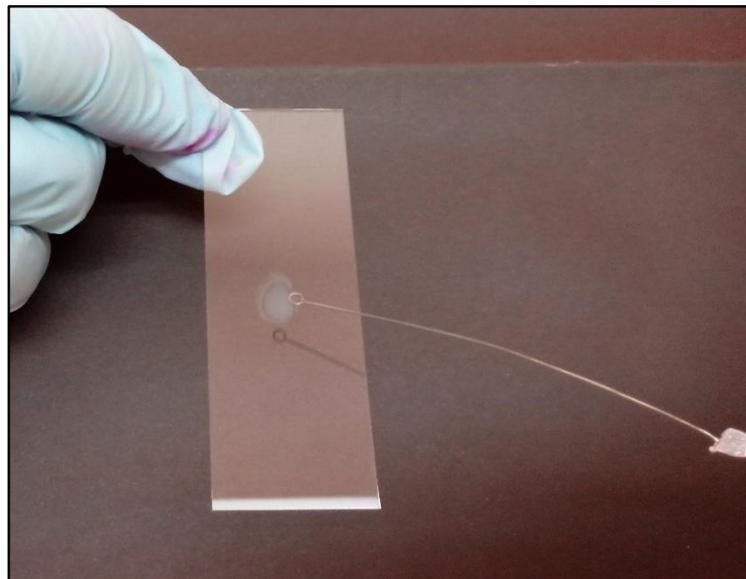
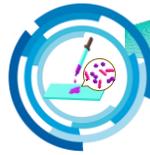


Figura 51. Extensión y homogeneización de la muestra *.

* Fotografía tomada por los autores.



3

Fijar el frotis con calor pasando el portaobjetos de 3 a 4 veces por encima de la llama del mechero Bunsen (figura 52), cuidando que no se exceda la temperatura de exposición al calor (figura 53), empleando como referencia que el calor del portaobjetos pueda ser tolerable para la parte interna de la mano.



Figura 52. Fijación de la preparación *.



Figura 53. Cuidado de la temperatura de fijación *.

* Fotografía tomada por los autores.



Realización de la tinción

4

Añadir unas gotas de solución de **crystal violeta** hasta cubrir la muestra y se deja actuar durante **10 s** (figura 54).



Figura 54. Aplicación de la solución de cristal violeta *.

5

Lavar el portaobjetos (figura 55), se cubre la preparación con **lugol** y se deja actuar durante **10 s** (figura 56). Antes de la decoloración con acetona (paso siguiente) todos los microorganismos aparecen de color púrpura, es decir, Gram positivos

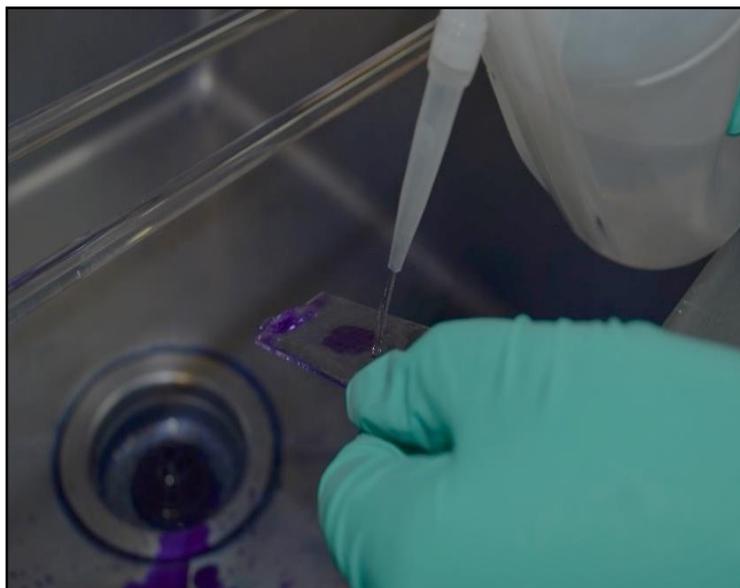


Figura 55. Lavado de la preparación *.

* Fotografía tomada por los autores.

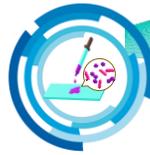


Figura 56. Aplicación de lugol *.

6

Lavar el exceso de yodo (figura 57). Añadir unas gotas de **alcohol acetona**, hasta decolorar (o máximo **10 s**) (figura 58).

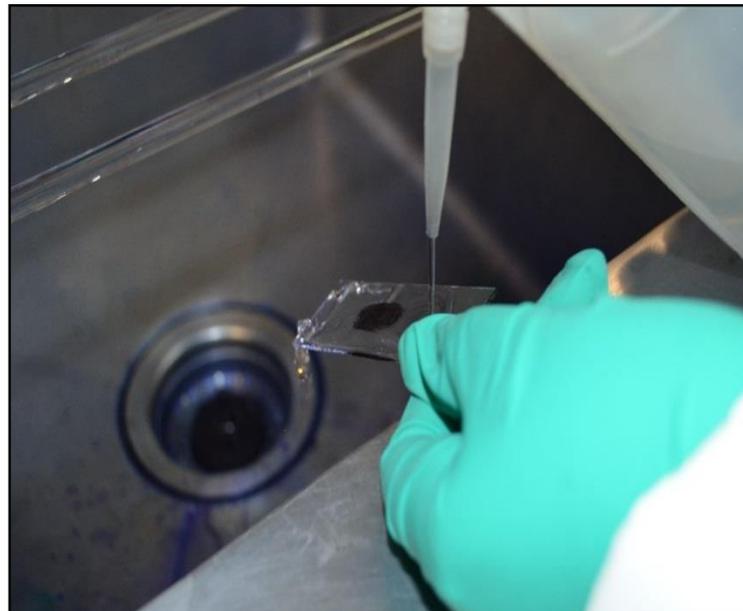


Figura 57. Lavado de la preparación *.

* Fotografía tomada por los autores.

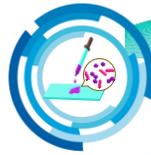


Figura 58. Aplicación alcohol-acetona *.

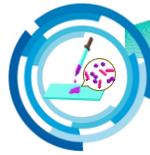
7

Inmediatamente lavar el portaobjetos con agua (figura 59). Después de la decoloración con alcohol acetona, los microorganismos Gram negativos ya no pueden verse.



Figura 59. Lavado de la preparación *.

* Fotografía tomada por los autores.



8

Aplicar el colorante de contraste **safranina** cubriendo la muestra, durante **10 s** (figura 60).



Figura 60. Aplicación de la safranina *.

9

Lavar con agua y dejar secar al aire (figura 61). Después de aplicar el colorante de contraste, con esto se podrán observar los microorganismos Gram negativos.

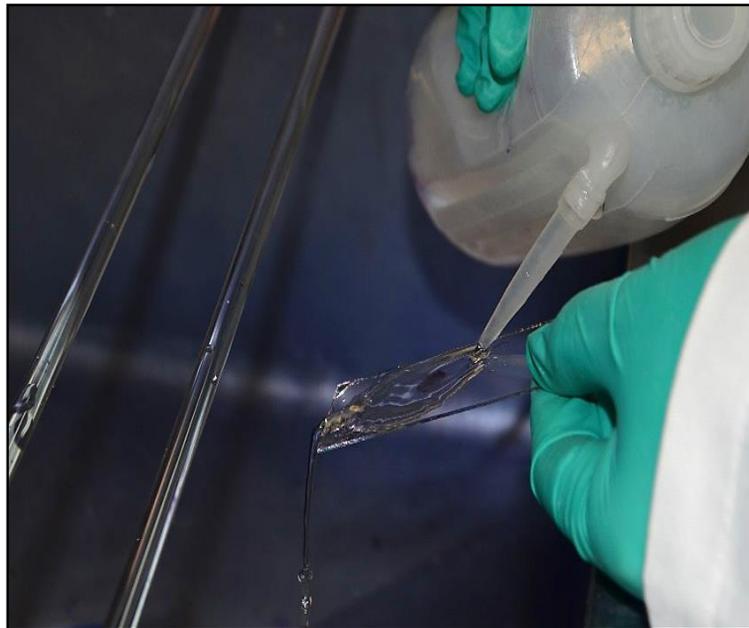


Figura 61. Lavado de la preparación *.

* Fotografía tomada por los autores.



10

Observar al microscopio con objetivos de 40X y 100X (figura 62).

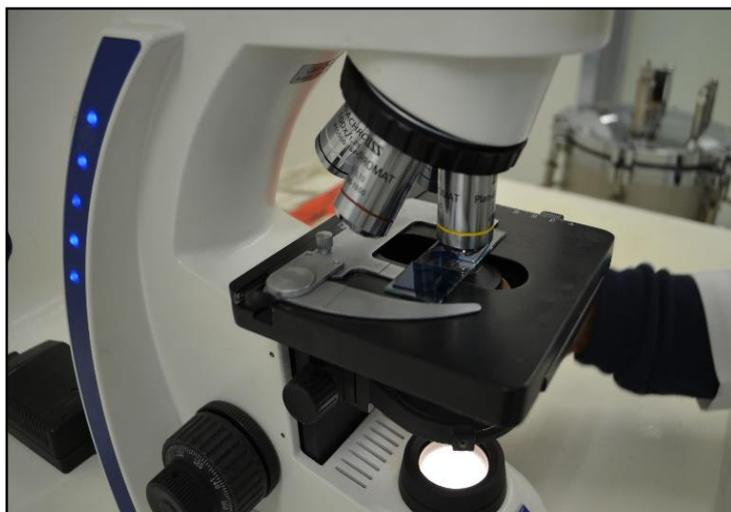


Figura 62. Observación al microscopio *.

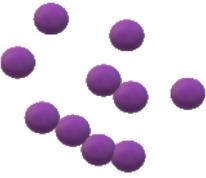
Interpretación	
	
Gram positivas: mantienen el color azul-violeta	Gram negativas: se tiñen de color rojo-rosa

Figura 63. Interpretación de tinción de Gram **.

Nota 1: Para desechar el material biológico empleado durante el procedimiento deben seguirse las indicaciones marcadas en el apartado de “Fase post-analítica”, en la página 166.

Nota 2: Algunas limitaciones para la utilización de esta técnica de tinción pueden observarse en la página 195 (anexo 6.3.1).

* Fotografía tomada por los autores.

** Esquema realizado por los autores.

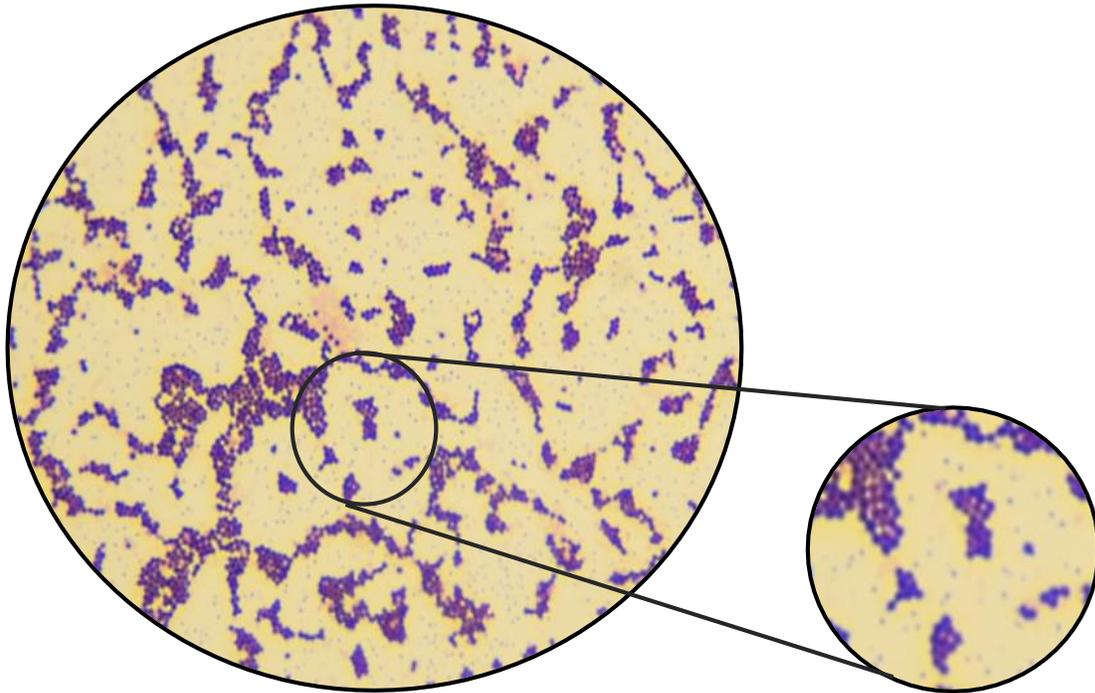
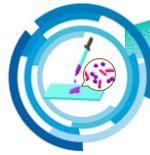


Figura 64. *Staphylococcus aureus*, tinción de Gram, 100X *.

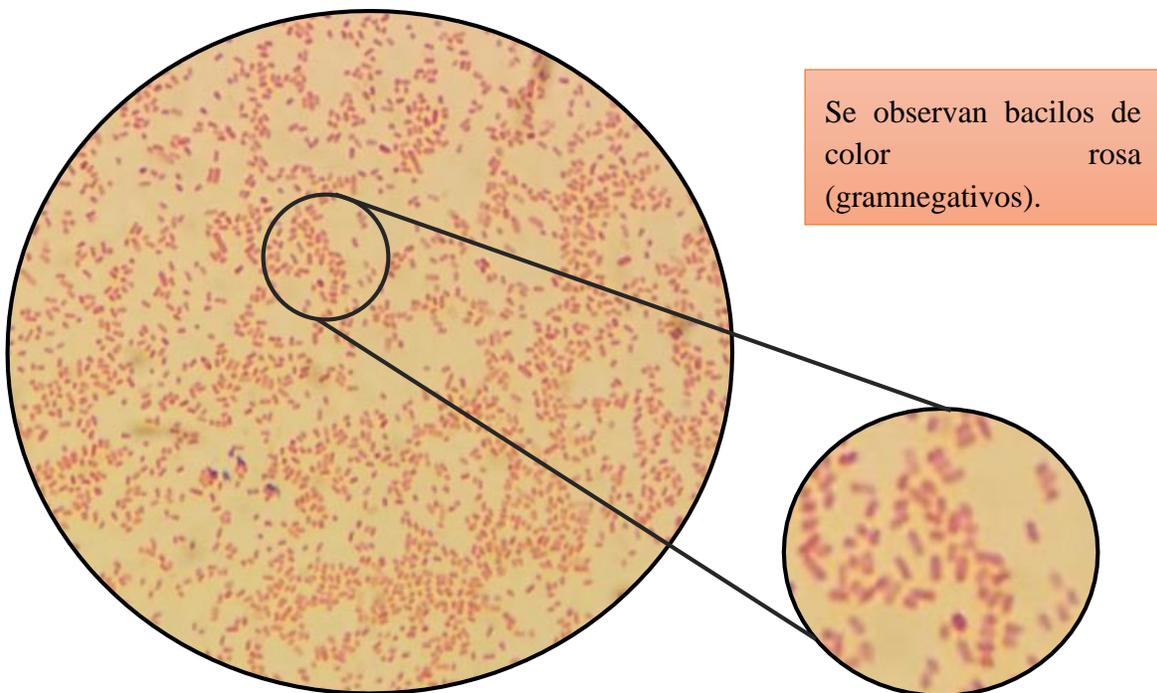


Figura 65. *Escherichia coli*, tinción de Gram, 100X *.

* Fotografía tomada por los autores.

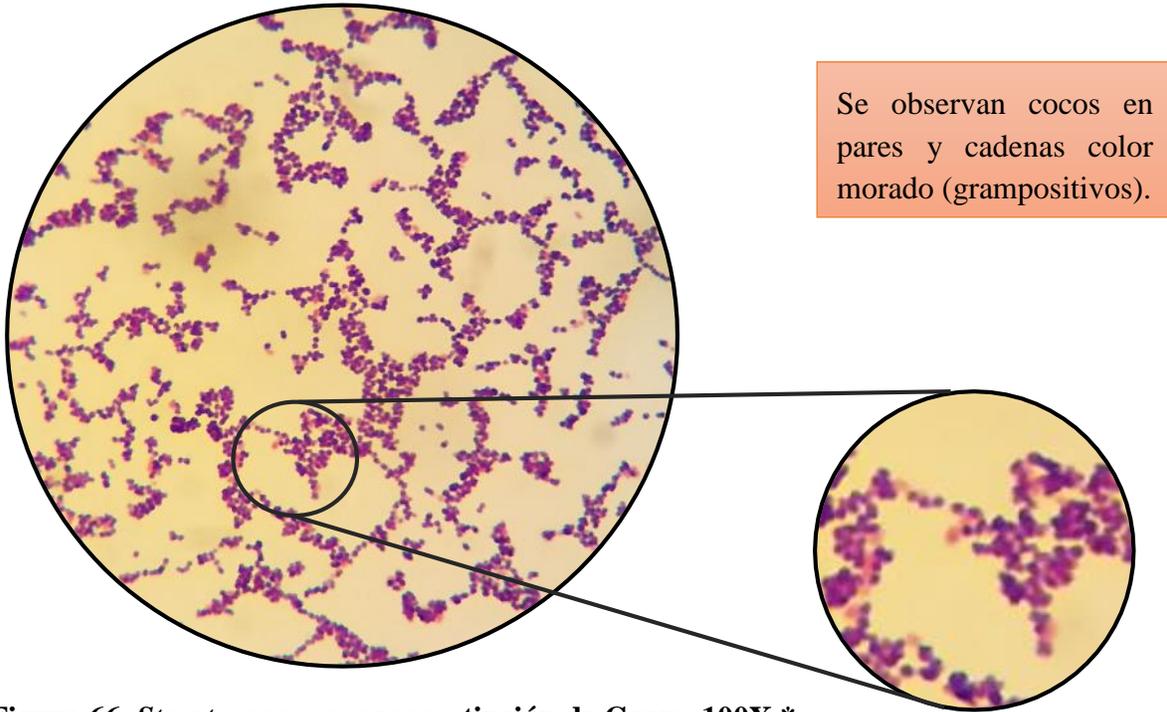
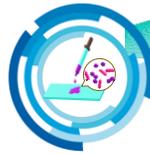


Figura 66. *Streptococcus pyogenes*, tinción de Gram, 100X *.

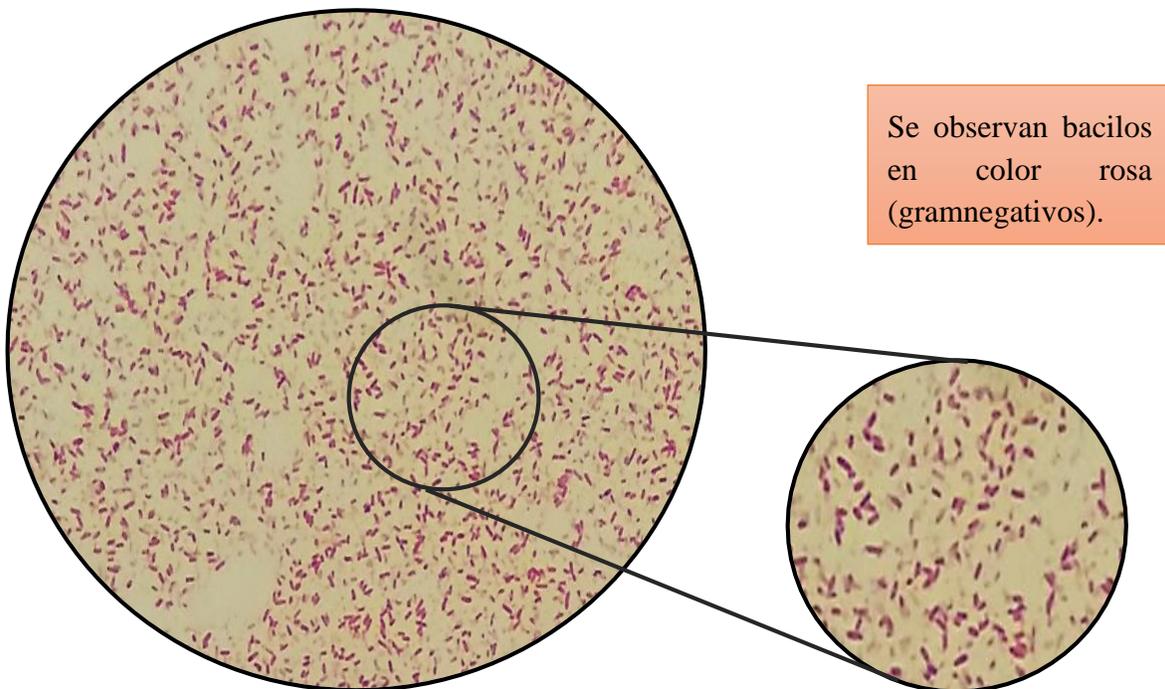


Figura 67. *Pseudomonas aeruginosa*, tinción de Gram, 100X *.

* Fotografía tomada por los autores.



3.2.1.1.2 Tinción de Ziehl Neelsen o ácido resistente

La tinción Ziehl Neelsen o de ácido alcohol resistencia, ha demostrado ser una de las tinciones características más útiles y significativas para separar los bacilos tuberculosos y los microorganismos relacionados. Es una técnica rápida, fácil y de bajo costo, lo que permite que se pueda realizar en casi cualquier laboratorio clínico. Esta tinción permite diferenciar a las bacterias en dos grupos: aquellos que son capaces de resistir la decoloración con alcohol-ácido y aquellos que no lo son ^(49,50).

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 ⁽⁴⁹⁾.

3.2.1.1.2.1 Fundamento de la tinción de Ziehl Neelsen

Las micobacterias están cubiertas por un material grueso, ceroso, que resiste la tinción. No obstante, una vez que se tiñen las paredes celulares bacterianas resisten la decoloración por disolventes orgánicos fuertes, como el alcohol ácido, debido al ácido micólico que se encuentra presente. Además, se caracterizan por su posesión única de ciertos tipos de ácidos grasos, alcoholes superiores y carbohidratos. Aunque hay muchos ácidos grasos diferentes en las micobacterias, los ácidos micólicos parecen existir sólo en las paredes celulares de estos microorganismos, de las nocardias y de las corinebacterias ^(26, 28, 21).

Los ácidos micólicos no son idénticos, pero todos son hidroxiácidos de alto peso molecular ópticamente activos que contienen grupos carboxilo (necesario para la resistencia a los ácidos) y metoxilo. Un arabinogalactano de gran tamaño, unido en forma covalente al peptidoglucano y a unos 30 residuos de ácidos micólicos, forma un puente entre la capa rígida y las capas externas lipofílicas de la pared celular ^(26, 28, 21).

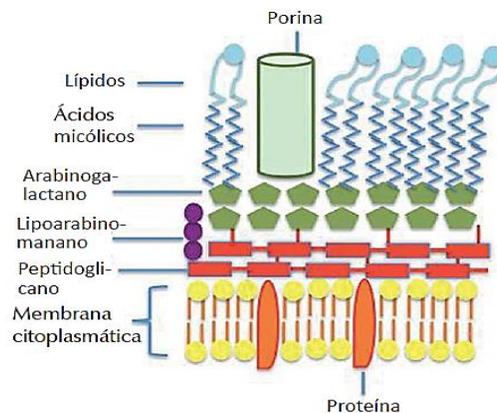


Figura 68. Esquema de la composición de la pared celular de las micobacterias ⁽⁴⁹⁾.



En la técnica convencional de Ziehl Neelsen se utiliza calor, una vez que la carbolfucsina se deposita en la superficie del extendido a teñir, se pasa por debajo del portaobjeto la llama de un mechero de Bunsen. El calentamiento permite solubilizar las ceras, lípidos y otros ácidos grasos de la pared celular para una mayor penetración del colorante primario (carbolfucsina), el cual tiene una gran afinidad por los ácidos micólicos presentes en la pared y así forman complejos con el colorante. Al enfriar con agua, los componentes de la pared vuelven a solidificar, resistiendo la acción abrasiva del alcohol ácido y el azul de metileno ^(25, 30, 53, 28).

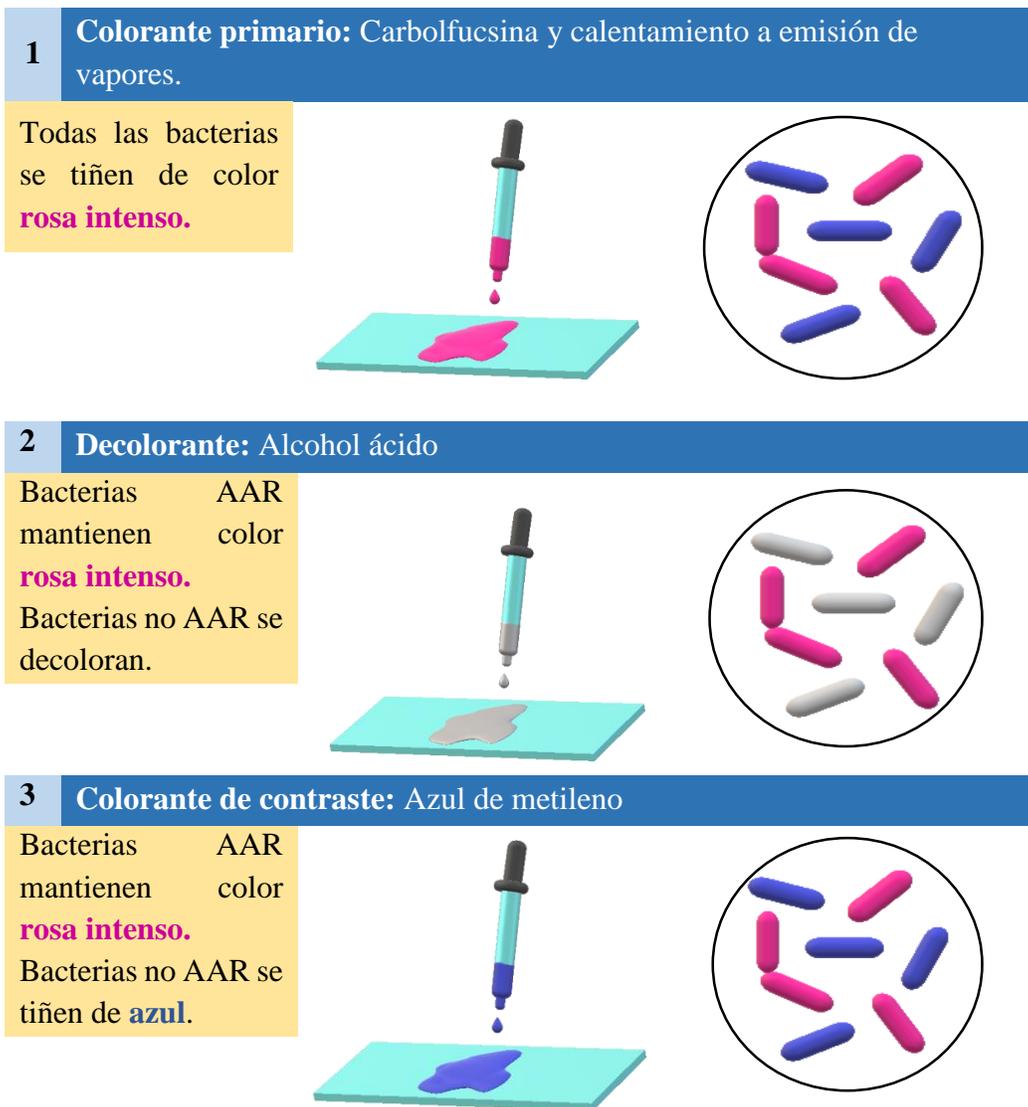


Figura 69. Esquema de la técnica de la tinción de Ziehl Neelsen **. Nota: entre cada paso se realizan lavados con agua.

** Esquema realizado por los autores.



De acuerdo a las características y condiciones del laboratorio para fines de este libro, se seleccionaron los tiempos más adecuados para dicha tinción y el procedimiento llevado a cabo se presenta a continuación:

Tinción de Ziehl Neelsen o ácido resistente			
Referencia	Ramos J	- Rodríguez E, Gamboa M, et al - Brooks GF, Carroll KC, et al	Delgado A, Prieto S, Amich S, Salvo ML
Carbol fucsina	5 min	5 min	5-10 min
Ácido alcohol	Hasta decolorar.	Hasta que solo salga una traza rosa de la preparación o que persista un color rosa débil	Durante 1 min (asegurarse de que no se desprenda más coloración roja)
Azul de metileno	2 min	1 min	1 min

Cuadro 7. Tiempos empleados para cada reactivo por diferentes autores para la tinción ácido resistente ^(30, 54, 55,56).

3.2.1.1.2.2 Microorganismos empleados o de importancia

A continuación, se muestran algunas de las características más importantes de algunos de los microorganismos que pueden ser teñidos mediante ésta técnica de tinción.

- *Mycobacterium tuberculosis*

Es el principal representante de las micobacterias. Se caracterizan por ser bacilos Gram positivos, ácido alcohol resistentes, ligeramente curvados, aerobios estrictos, inmóviles, no formadores de esporas ni cápsulas y de crecimiento lento. *Mycobacterium tuberculosis* es el agente causal de la tuberculosis, una de las enfermedades infecciosas más letales en el mundo. En condiciones adversas puede entrar en estado de latencia ⁽⁵⁷⁾.

- *Mycobacterium phlei*

Varios bacilos ácido-alcohol resistentes encontrados en las plantas, en el suelo y en el agua, se cultivan con más rapidez que los bacilos de la tuberculosis; su papel en la naturaleza concierne principalmente a la degradación de los lípidos. Estos organismos no han sido establecidos como patógenos y algunos de ellos son: *M. phlei* (bacilo de la gramínea *Phleum pratense*) y *M. smegmatis*, ambos organismos se encuentran también en el polvo, el suelo y el agua ⁽¹²⁾.



3.2.1.1.2.3 Procedimiento de la tinción de Ziehl Neelsen

Material	Aparatos y equipo	Reactivos	Cepas
-Asa bacteriológica -Portaobjetos -Mechero Bunsen con manguera -Encendedor -Piseta -Tripié -Vaso de precipitado de 100 mL -Gradilla	-Microscopio -Cronómetro	-Carbol fucsina -Ácido alcohol; H_2SO_4 al 3% en etanol al 95%. -Azul de metileno -Aceite de inmersión -Agua	- <i>Mycobacterium phlei</i> (ATCC 12298)

Cuadro 8. Material, aparatos, equipos, reactivos y cepas empleadas para la tinción de Ziehl Neelsen.

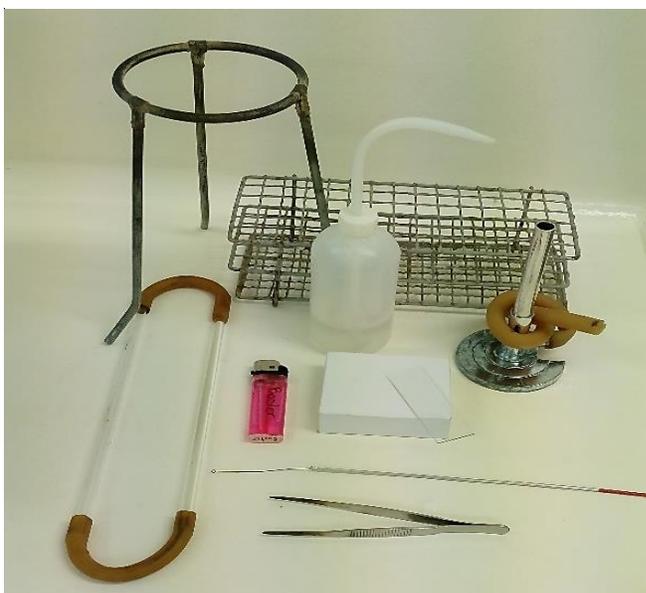


Figura 70. Material necesario para la tinción de Ziehl Neelsen *.



Figura 71. Aparatos y equipo a emplear en la tinción de Ziehl Neelsen *.

* Fotografía tomada por los autores.



Figura 72. Reactivos a emplear en la tinción de Ziehl Neelsen *.

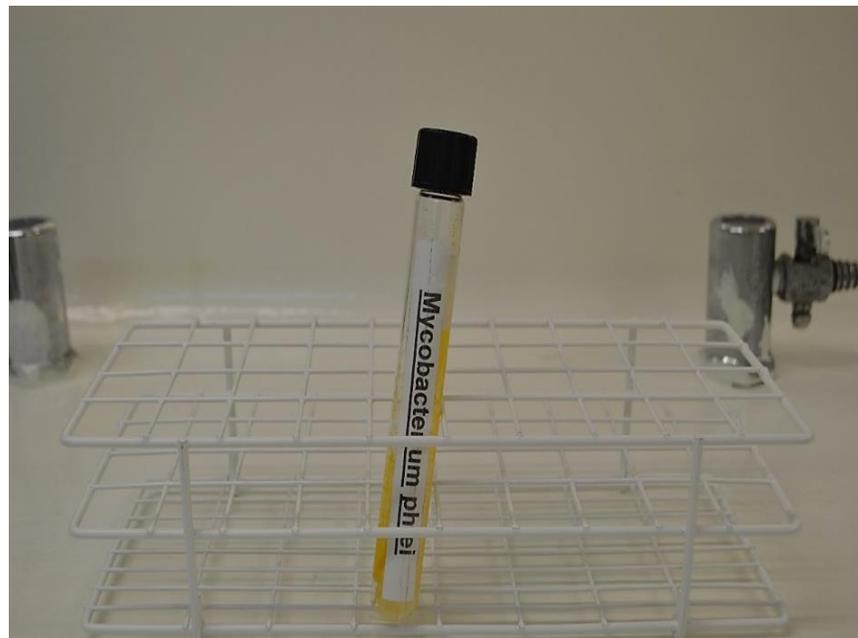
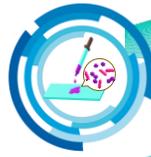


Figura 73. Cepa a emplear en la tinción de Ziehl Neelsen *.

* Fotografía tomada por los autores.



Tinción de Ziehl Neelsen ⁽³⁰⁾

Preparación del espécimen o muestra

1

Colocar en el portaobjetos una microgota de agua con ayuda del asa bacteriológica (figura 74).

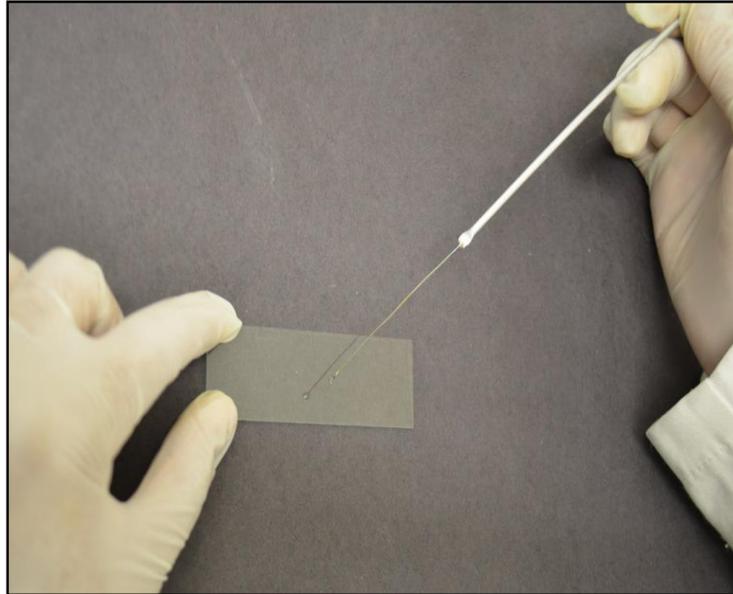


Figura 74. Colocación de microgota *.

2

Realizar una extensión con el material a estudiar (ver página 52) y homogeneizar con ayuda del asa bacteriológica (figura 75).

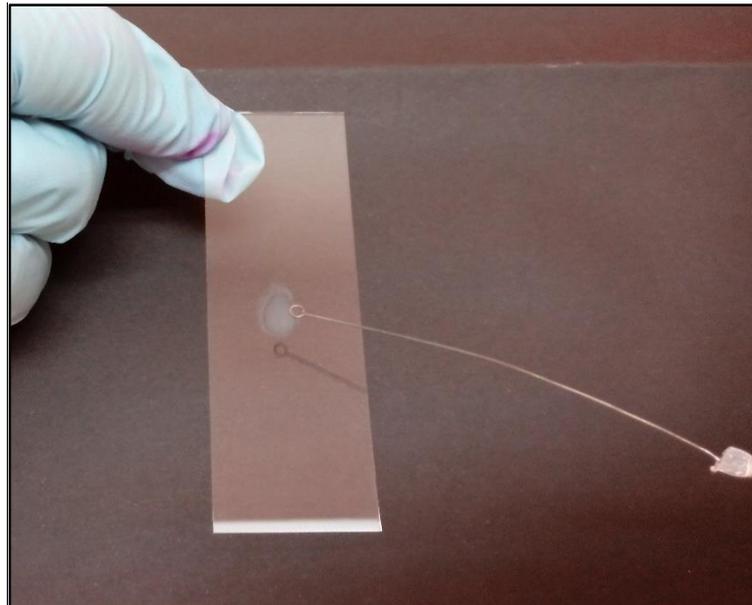
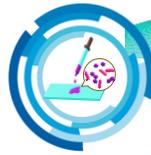


Figura 75. Extensión y homogeneización de la muestra *.

* Fotografía tomada por los autores.



3

Fijar el frotis con calor pasando el portaobjetos de 3 a 4 veces por encima de la llama del mechero Bunsen (figura 76), cuidando que no se exceda la temperatura de exposición al calor (figura 77), empleando como referencia que el calor del portaobjetos pueda ser tolerable para la parte interna de la mano.



Figura 76. Fijación de la preparación *.



Figura 77. Cuidado de la temperatura de fijación *.

* Fotografía tomada por los autores.



Realización de la tinción

4

Agregar el reactivo de **carbolfucsina** al portaobjetos que contiene la muestra (figura 78).

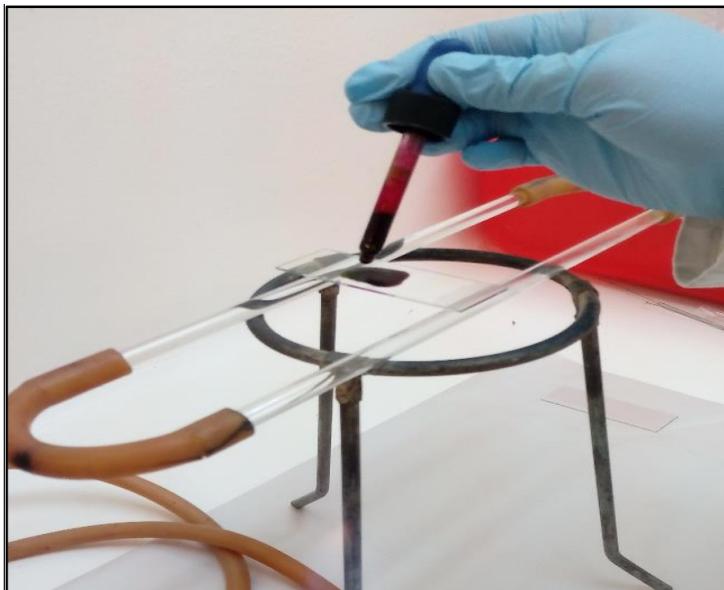


Figura 78. Aplicación de carbolfucsina *.

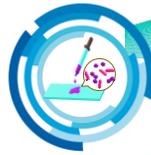
5

Calentar por 5 min a emisión de vapores del colorante, para permitir la fijación del colorante primario en las paredes celulares bacterianas. Para esto se debe hacer uso del mechero y pasar su flama directamente debajo del portaobjetos, retirándolo de éste cuando se observe el vapor que se desprende de la muestra, pero sin dejar que hierva (figura 79). No dejar que el reactivo se seque, para lo cual se debe colocar constantemente gotas del reactivo.



Figura 79. Calentamiento de la preparación a emisión vapores *.

* Fotografía tomada por los autores.



6

Lavar con agua (figura 80).



Figura 80. Lavar con agua*.

7

Decoloración con **alcohol ácido**; H₂SO₄ a 3% en etanol a 95% (figura 81) y lavar con agua, durante **1 min** (figura 82).

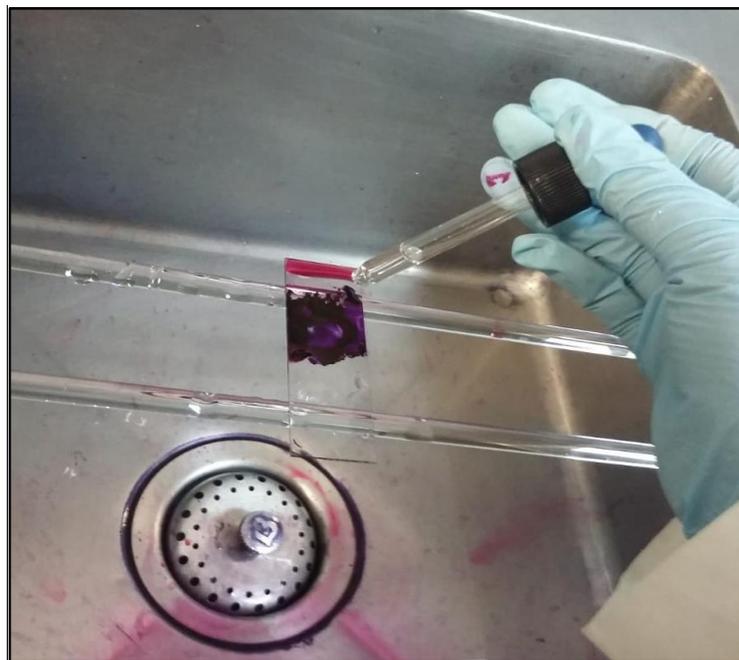


Figura 81. Aplicación de alcohol ácido*.

* Fotografía tomada por los autores.

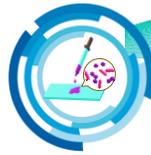


Figura 82. Lavado de la preparación *.

7

Agregar el colorante secundario o de contraste (**azul de metileno** durante **30 s**) (figura 83) y lavar con agua (figura 84).

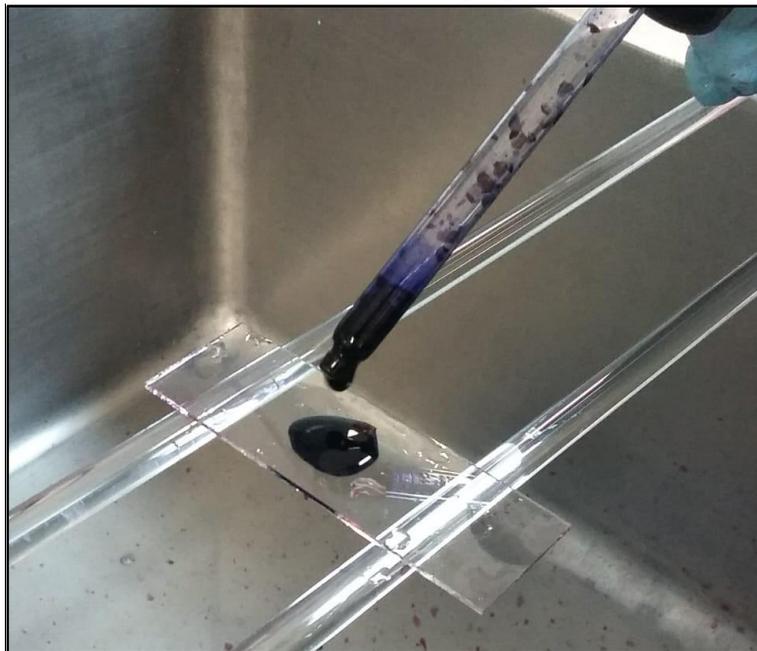


Figura 83. Aplicación de azul de metileno *.

* Fotografía tomada por los autores.



Figura 84. Lavado de la preparación *.

8

Observar al microscopio con objetivos de 40X y 100X (figura 85).

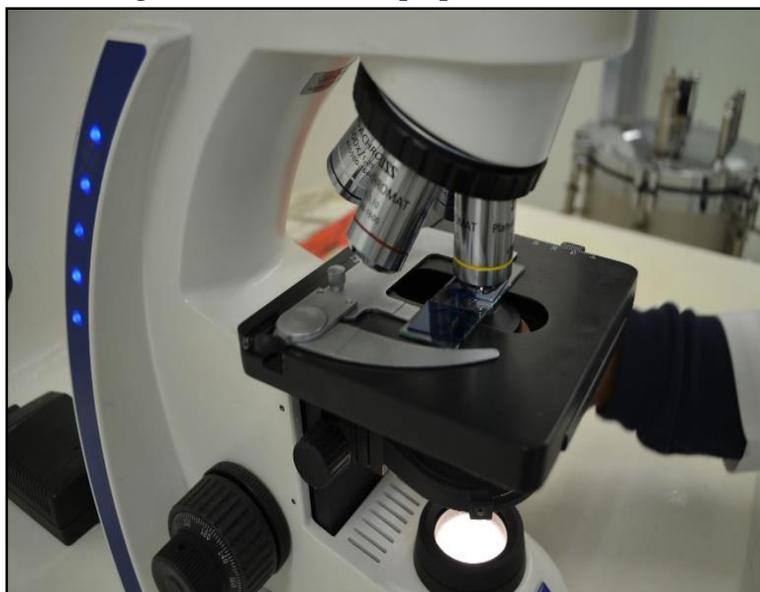
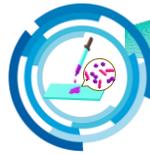


Figura 85. Observación al microscopio *.

Nota 1: Para desechar el material biológico empleado durante el procedimiento deben seguirse las indicaciones marcadas en el apartado de “Fase post-analítica”, en la página 166.

Nota 2: Algunas limitaciones para la utilización de esta técnica de tinción pueden observarse en la página 196 (anexo 6.3.2).

* Fotografía tomada por los autores.



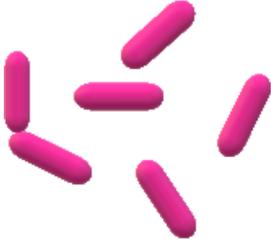
Interpretación	
	
AAR (+) : mantienen el color rosa	AAR (-) : se tiñen de color azul

Figura 86. Interpretación de tinción de Ziehl Neelsen **.

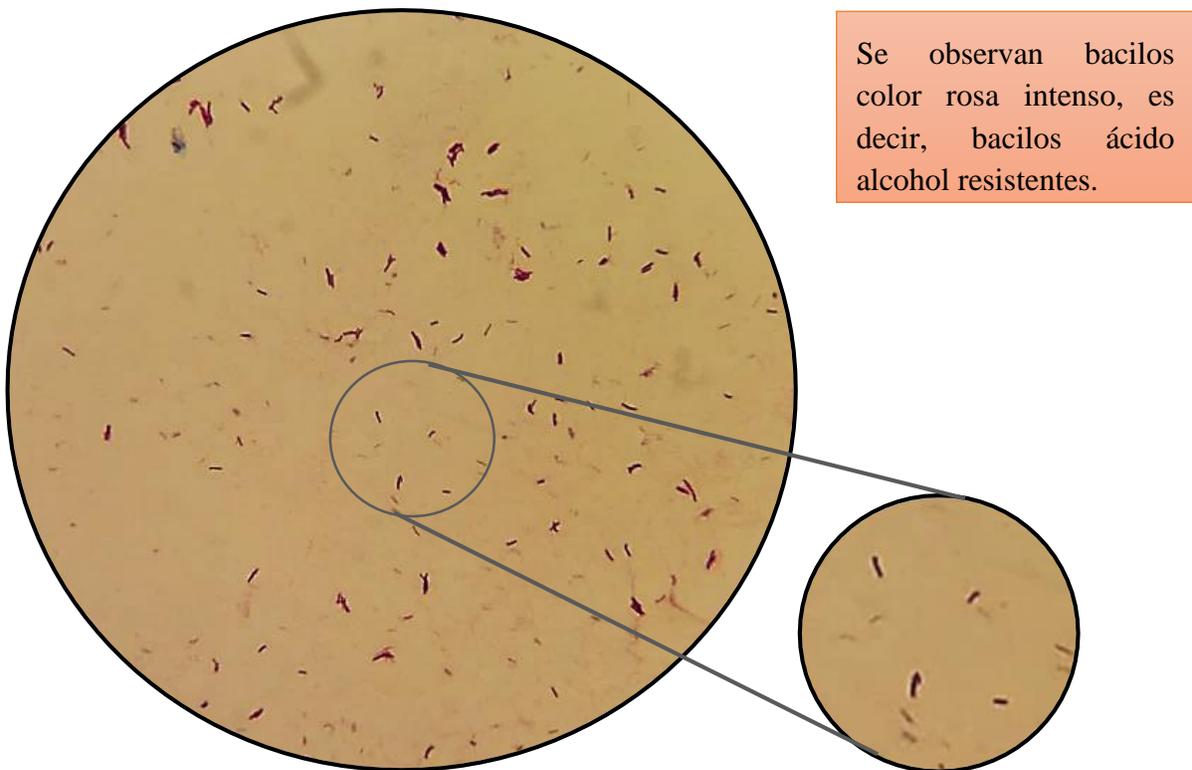
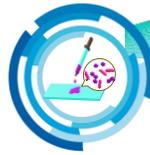


Figura 87. *Mycobacterium phlei*, tinción de Ziehl Neelsen, 100X *.

* Fotografía tomada por los autores.

**Esquema realizado por los autores.



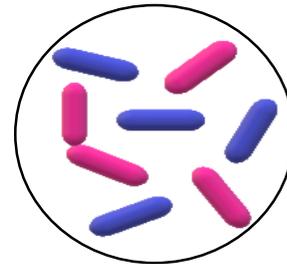
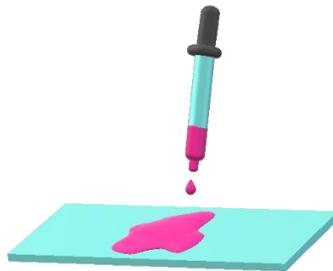
3.2.1.1.3 Tinción de Kinyoun

3.2.1.1.3.1 Fundamento de la tinción de Kinyoun

Esta tinción proviene de la modificación de la tinción de Ziehl Neelsen, por lo tanto, ambas técnicas se interpretan de la misma forma y tienen como base el mismo fundamento, pero se diferencian en dos aspectos: en el reactivo principal (debido a que en Kinyoun se utiliza carbol fucsina tergitol) y en que la técnica de Kinyoun no utiliza calor. El objetivo de esta tinción, al igual que la tinción de Ziehl Neelsen, consiste en diferenciar a los microorganismos Bacilo Alcohol Resistentes (BAAR) positivos de los no positivos. La modificación de Kinyoun a la técnica de Ziehl Neelsen se denomina "método frío", porque utiliza un detergente tensoactivo como el tergitol, en lugar de tratamiento con calor. Esta coloración permite una tinción más rápida que el clásico procedimiento de Ziehl Neelsen y evita la necesidad de calentamiento ^(30, 31).

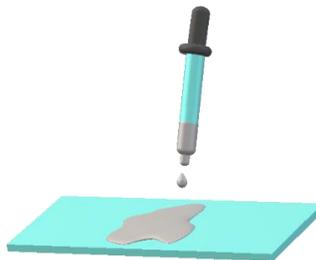
1 Colorante primario: Carbol fucsina tergitol

Todas las bacterias se tiñen de color **rosa intenso**.



2 Decolorante: Alcohol ácido

Bacterias AAR mantienen color **rosa intenso**.
Bacterias no AAR se decoloran.



Continúa en la siguiente página



3 Colorante de contraste: Azul de metileno

Bacterias AAR mantienen color **rosa intenso**. Bacterias no AAR se tiñen de **azul**.

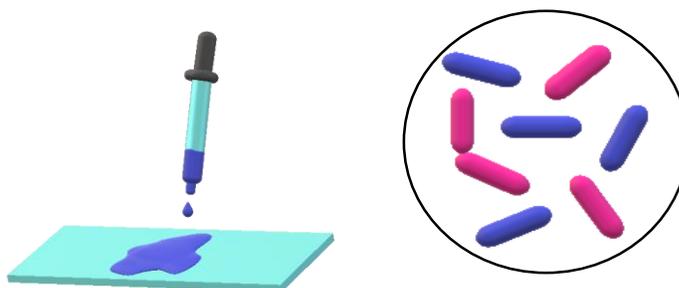


Figura 88. Esquema de la técnica de la tinción de Kinyoun. Nota: entre cada paso se realizan lavados con agua **.

El procedimiento llevado a cabo con los tiempos empleados para esta tinción se presenta a continuación, pero para ello fue necesario realizar la comparación de tiempos empleados por diversos autores:

Tinción de Kinyoun			
Referencia	Brooks GF, Carroll KC, et al.	Koneman EW, Allen SD, et al.	Goldman E, Green LH
Fucsina de Kinyoun	3 min	5 min	3-5 min
Ácido alcohol	Decolorar	3 min. o hasta que no aparezca más color rojo.	Hasta que desaparezca el color (cerca de 2 min)
Azul de metileno	1 min	3-4 min	30-60 s

Cuadro 9. Tiempos empleados para cada reactivo por diferentes autores para la tinción de Kinyoun ^(50, 55, 58).

** Esquema realizado por los autores.



3.2.1.1.3.2 Microorganismos empleados o de importancia

- *Rhodococcus equi*

Rhodococcus equi, es un patógeno intracelular facultativo Gram positivo con similitudes con *Mycobacterium tuberculosis*. El patógeno *R. equi* infecta una gran variedad de hospedadores animales, pero se asocia más frecuentemente con la enfermedad bronconeumonial en caballos y está cada vez más aislado de los humanos inmunocomprometidos. El número creciente de infecciones por *R. equi* en humanos se ha observado durante varios años y ahora *R. equi* se considera un patógeno zoonótico emergente. Los casos clínicos en humanos son raros y hasta ahora se han diagnosticado en pacientes inmunocomprometidos. Las fuentes y vías de infección humana siguen sin estar claras. Se ha sugerido que el contacto con animales de granja o su entorno puede desempeñar un papel en algunos casos de infección, pero la transmisión por alimentos parece ser la ruta más probable, especialmente la exposición por el consumo de carne cruda, poco cocida o contaminada ⁽⁵⁹⁾. También se ha sugerido que la transmisión de la infección en potros se produce por inhalación de polvo contaminado o partículas del suelo. *R. equi* representa una gran amenaza para la salud de los potros en todo el mundo y tiene un impacto económico significativo en la industria de la cría de caballos ⁽⁶⁰⁾.

La incidencia de rodococosis humana ha aumentado a nivel mundial, y la enfermedad representará un problema de salud emergente en los próximos años. La patogenicidad de *R. equi* se ha atribuido a la presencia de proteínas asociadas a la virulencia codificadas por plásmidos (Vap), que aparentemente son esenciales para la supervivencia del patógeno dentro de las células fagocíticas ⁽⁶¹⁾.

Rhodococcus equi es ubicuo en el suelo y tiene una distribución mundial; su capacidad para invadir el macrófago y prevenir la fusión del fagosoma lisosoma crea dificultades en el tratamiento, con la terapia de combinación antimicrobiana a largo plazo necesaria. La naturaleza intracelular de *R. equi* complica el desarrollo de la vacuna, al igual que el sistema inmune inmaduro del potro neonatal. Las vacunas tradicionales han sido ineficaces, aunque actualmente hay algunos avances. Una opción disponible es el uso de plasma hiperinmune equino como un plasma adulto comercial específico para *R. equi*, aunque se discute la efectividad y el mecanismo de acción no está claro. Su diagnóstico clínico es difícil; sin embargo, los métodos tradicionales de cultivo y tinción se utilizan en el aislamiento e identificación del organismo ⁽⁶²⁾.



3.2.1.1.3.3 Procedimiento de la tinción de Kinyoun

Material	Aparatos y equipo	Reactivos	Cepas
-Asa bacteriológica -Portaobjetos -Mechero Bunsen con manguera -Piseta -Goteros para cada reactivo -Encendedor -Gradilla	-Microscopio -Cronómetro	-Carbolfucsina tergitol -Solución de ácido alcohol -Azul de metileno -Aceite de inmersión -Agua	- <i>Rhodococcus equi</i>

Cuadro 10. Material, aparatos, equipos, reactivos y cepas empleadas para la tinción de Kinyoun.



Figura 89. Material necesario para la tinción de Kinyoun *.



Figura 90. Aparatos y equipo a emplear en la tinción de Kinyoun *.

* Fotografía tomada por los autores.

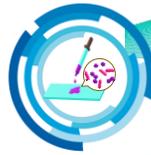
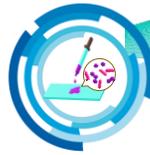


Figura 91. Reactivos a emplear en la tinción de Kinyoun *.



Figura 92. Cepa a emplear en la tinción de Kinyoun *.

* Fotografía tomada por los autores.



Tinción de Kinyoun ⁽⁵⁸⁾

Preparación del espécimen o muestra

1

Colocar en el portaobjetos una microgota de agua con ayuda del asa bacteriológica (figura 93).

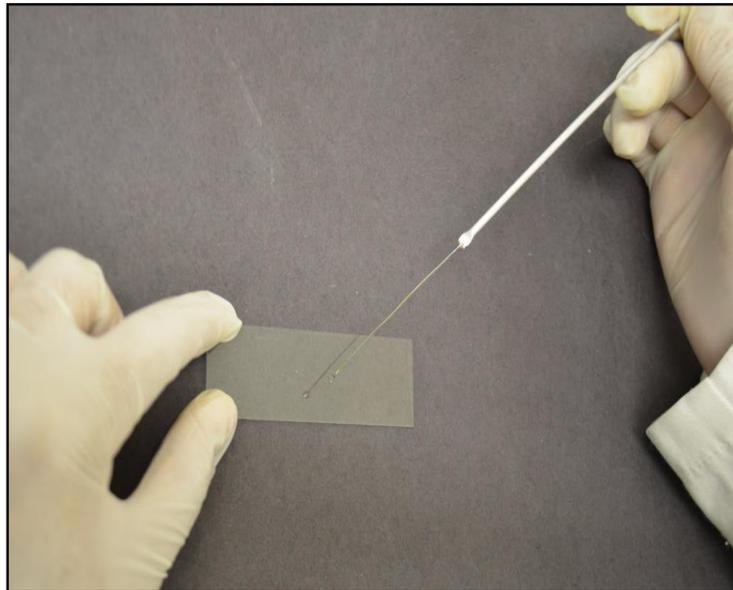


Figura 93. Colocación de microgota *.

2

Realizar una extensión con el material a estudiar (ver página 52) y homogeneizar con ayuda del asa bacteriológica (figura 94).

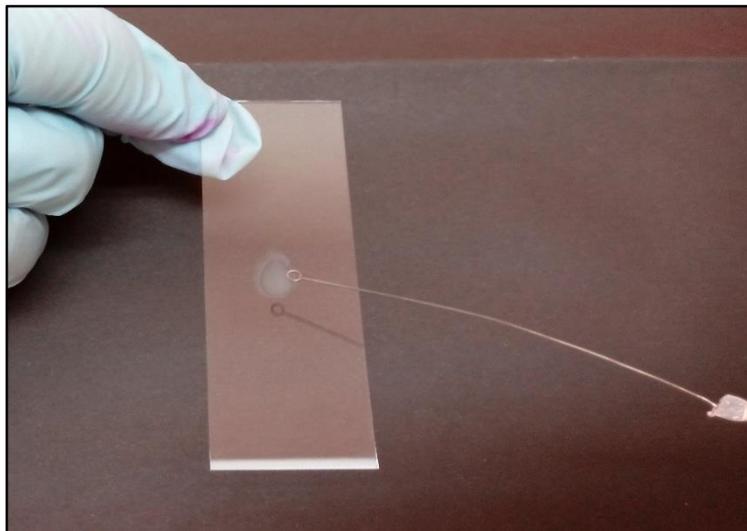
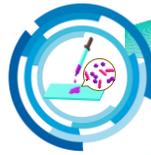


Figura 94. Extensión y homogeneización de la muestra *.

* Fotografía tomada por los autores.



3

Fijar el frotis con calor pasando el portaobjetos de 3 a 4 veces por encima de la llama del mechero Bunsen (figura 95), cuidando que no se exceda la temperatura de exposición al calor (figura 96), empleando como referencia que el calor del portaobjetos pueda ser tolerable para la parte interna de la mano.

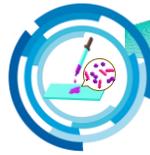


Figura 95. Fijación de la preparación *.



Figura 96. Cuidado de la temperatura de fijación *.

* Fotografía tomada por los autores.



Realización de la tinción

4

Agregar **carbolfucsina** **tergitol** y dejar actuar **5 min** (figura 97).

¡Es muy importante **NO calentar** la muestra mientras se agrega este reactivo!



Figura 97. Aplicación de carbolfucsina con tergitol*.

5

Lavar con agua (figura 98).

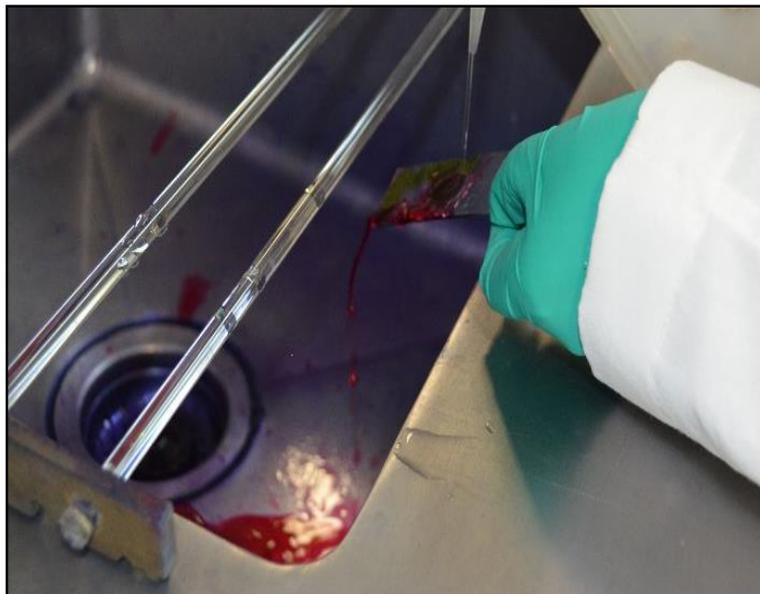
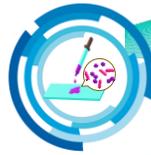


Figura 98. Lavado de la preparación*.

* Fotografía tomada por los autores.



6

Decolorar con **alcohol ácido** durante **1 min** (figura 99).



Figura 99. Aplicación de alcohol ácido *.

7

Lavar con agua (figura 100).

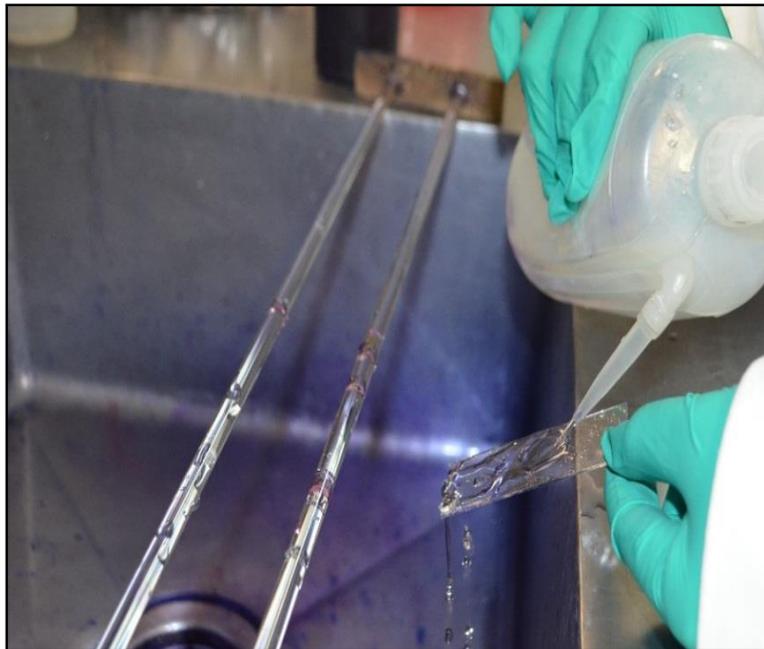


Figura 100. Lavado de la preparación *.

* Fotografía tomada por los autores.



8

Agregar el colorante de contraste, es decir, **azul de metileno**, por **30 s** y lavar con agua (figura 101).



Figura 101. Aplicación de azul de metileno *.

9

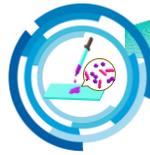
Observar al microscopio con objetivos de 40X y 100X (figura 102).



Figura 102. Observación al microscopio *.

Nota 1: Es importante no calentar al agregar el carbolfucsina tergitol, tal como lo indica el paso número uno de la “realización de la tinción”, debido a que es un paso determinante para la realización de esta tinción ⁽⁶³⁾.

* Fotografía tomada por los autores.



Nota 2: Para desechar el material biológico empleado durante el procedimiento deben seguirse las indicaciones marcadas en el apartado de “Fase post-analítica”, en la página 166.

Interpretación	
	
AAR (+) : mantienen el color rosa	AAR (-) : se tiñen de color azul

Figura 103. Interpretación de tinción de Kinyoun **.

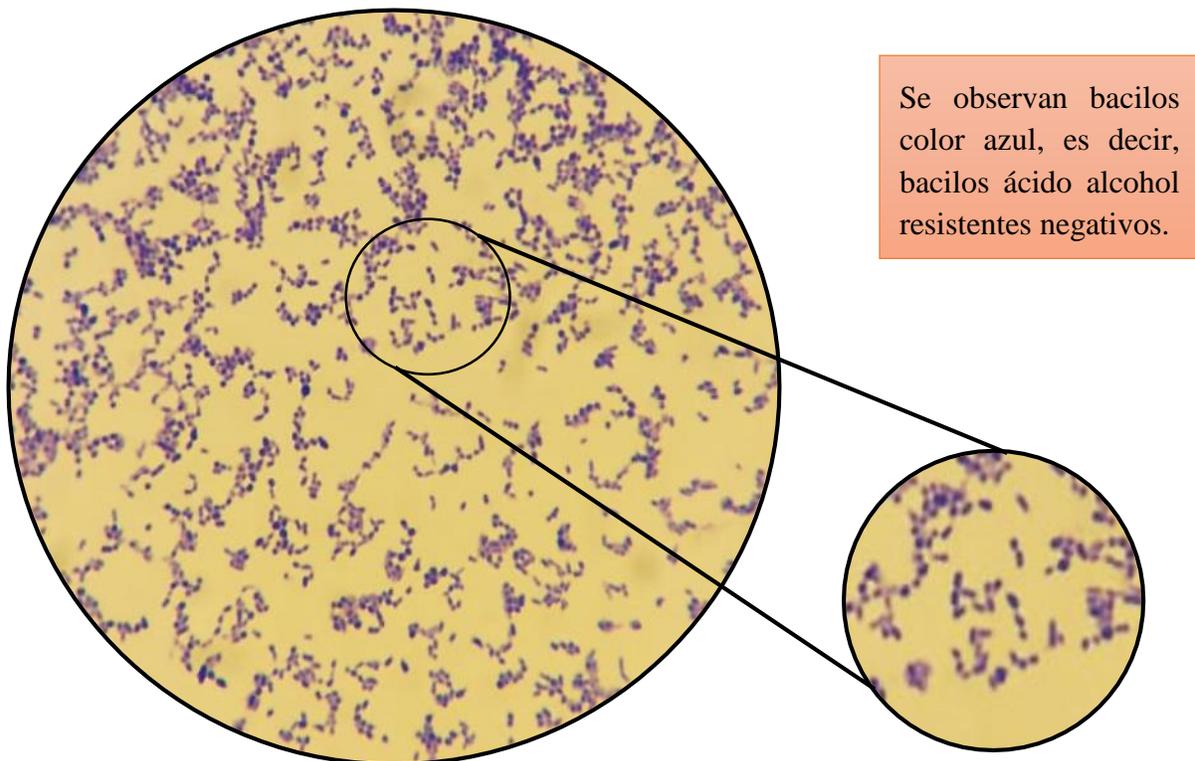


Figura 104. *Rhodococcus equi*, tinción de Kinyoun, 100X (Autoría propia).

* Fotografía tomada por los autores.

** Esquema realizado por los autores.



Nota: Desde el punto de vista de morfológico microscópico, *R. equi* es un cocobacilo Gram positivo pleomórfico, variando el porcentaje de presentación de la forma cocoide o bacilar según las condiciones de crecimiento y la fase en que éste se encuentre. En los medios sólidos suele presentarse en morfología cocoide, mientras que en los medios líquidos, especialmente si el cultivo es joven, puede aparecer como bacilos largos o filamentos cortos con ramificaciones pequeñas. Se ha comunicado que *R. equi* es un organismo ácido-alcohol resistente, sin embargo, ésta característica es variable y depende principalmente de la edad del cultivo, entre otras características ⁽⁶⁴⁾.

3.2.1.2 Tinciones especiales

Este tipo de tinciones se emplean para resaltar las características o estructuras específicas de las bacterias, ya sea cápsulas, flagelos, esporas, gránulos metacromáticos, entre otras ⁽³⁰⁾.

3.2.1.2.1 Tinción de cápsula

La cápsula es una capa mucosa, bien organizada, más o menos gruesa, que envuelve la pared celular de algunas bacterias. Está compuesta de polisacáridos, mucopolisacáridos o polipéptidos que la propia bacteria excreta a través de su pared celular. Las condiciones nutricionales y fisiológicas pueden reprimir o activar la síntesis de la cápsula, estructura que no es estrictamente necesaria para la supervivencia de la bacteria fuera de su hábitat natural. Se ha descrito que las cápsulas son responsables de la resistencia de las bacterias productoras a la fagocitosis, a los bacteriófagos, al complemento sanguíneo y otros mecanismos bactericidas. Así mismo, las cápsulas parecen proporcionar a la bacteria capacidad de adhesión a algunas superficies y confieren resistencia a la desecación gracias a que pueden retener agua en su interior ^(30, 14).

A consecuencia de su elevado contenido en agua, se tiñen débilmente por los colorantes, por ello algunas técnicas colorean el fondo de la preparación, destacando sobre él las cápsulas sin teñir. Los colorantes que se emplean en tinciones negativas se caracterizan porque no son capaces de fijarse ni penetrar en las células. Como consecuencia, las bacterias se ven “en negativo”, es decir, sin teñir, contrastando con el fondo que sí aparece coloreado ^(30, 14).

Una tinción negativa consiste en la aplicación de un colorante ácido (cargado negativamente). Por ello, los microorganismos, que también están cargados negativamente, no van a captar el colorante, quedando claros y brillantes sobre un fondo teñido oscuro. Este método proporciona una visión exacta de las células bacterianas y se consigue una imagen más real de su forma y tamaño, además de permitir observar si presentan o no cápsulas ⁽¹⁴⁾.

La capacidad de identificar la presencia de una cápsula es importante en el laboratorio clínico debido a que la presencia de dichas cápsulas generalmente se asocia con un aumento de la virulencia ⁽⁶⁵⁾.



3.2.1.2.1.1 Microorganismos empleados o de importancia

Dentro de las bacterias más representativas para la tinción de cápsulas se encuentra *Cryptococcus neoformans* y *Klebsiella pneumoniae*, por lo cual es necesario conocer sus características principales. Siendo además, *Klebsiella pneumoniae*, el microorganismo empleado en este libro.

- *Klebsiella pneumoniae*

El género *Klebsiella*, está formado por bacterias Gram negativas, inmóviles. *Klebsiella pneumoniae* (bacilo de Friedlander) es el más importante “patógeno” humano del grupo *Klebsiella*. Forma una cápsula y por esta razón produce colonias grandes, húmedas, frecuentemente muy mucosas ⁽¹²⁾.

Klebsiella pneumoniae se encuentra en el tracto respiratorio y en las heces del 5 al 10% de los individuos sanos y es con frecuencia un invasor secundario del aparato respiratorio de enfermos con enfermedad pulmonar crónica. Ocasiona aproximadamente el 3% de todas las neumonías bacterianas agudas y es el segundo patógeno más común del tracto urinario. Sus propiedades invasivas dependen del efecto antifagocítico de su cápsula: las cepas no capsuladas (R son avirulentas) ⁽¹²⁾.

- *Cryptococcus neoformans*

Este agente es un hongo levaduriforme, encapsulado y de distribución mundial, aislado con frecuencia en las deyecciones de los cerdos, aves y en el suelo. En el ser humano es capaz de producir un cuadro que varía desde la infección asintomática hasta la meningitis o la sepsis. La puerta de entrada es casi siempre la respiratoria tras la inhalación del germen en aerosol, diseminándose desde el pulmón hacia otros sitios ⁽⁶⁶⁾.

La meningitis/meningoencefalitis criptocócica (MCC) es una forma rara de infección del sistema nervioso, producida por *Cryptococcus neoformans*. Mundialmente, casi 1 millón de personas con virus de inmunodeficiencia humana (VIH) desarrollan la MCC cada año. En dependencia del tratamiento, hasta un 70 % muere en 3 meses. Históricamente, casos humanos de criptococosis en climas templados se atribuyen primariamente al *Cryptococcus neoformans* debido a su distribución a nivel mundial. El estudio del LCR con tinta china es el medio diagnóstico inicial de mayor eficacia ⁽⁶⁶⁾.

Las características más estudiadas sobre *C. neoformans* son la presencia de la cápsula polisacárida y la producción de melanina. El polisacárido capsular puede: Inhibir la producción de ciertas linfocinas provocando respuestas tanto celular como humoral muy débiles, enlazar e inmovilizar parcialmente a los anticuerpos dirigidos contra la pared celular y la cápsula del hongo y además, enmascarar a los anticuerpos. La reproducción asexual



representa el estado anamórfico, el cual está caracterizado por la producción de células levaduriformes gemantes (propágulos asexuales), que típicamente desarrollan una gran cápsula compuesta por polisacáridos. Las levaduras son redondas (4-6 μm de diámetro) o en ocasiones ovaladas. El estado sexual del hongo está caracterizado por la producción de basidiosporas ⁽⁶⁷⁾.

3.2.1.2.1.2 Tinción de tinta china

3.2.1.2.1.2.1 Fundamento de la tinción de tinta china

Las cápsulas, por sus características químicas, no se tiñen por lo general con colorantes básicos como el cristal violeta o la safranina. Sin embargo, se pueden observar indirectamente mediante tinción negativa con tinta china, ésta emplea una solución colorante en la cual el cromógeno es ácido y posee una carga negativa, la cual repele a la célula cargada negativamente, por lo que dicha célula permanece sin teñir contra un fondo coloreado. Además, este colorante está compuesto por partículas finas de carbono suspendidas en agua formando un auténtico coloide. Las partículas son demasiado grandes para penetrar a través de la matriz de la cápsula, por lo que sólo se teñirá el medio circundante y las células aparecerán sin teñir sobre un fondo de color negro ^(14, 35).

1 Colorante: tinta china

El colorante no tiñe a los microorganismos y la cápsula desplaza a las partículas de carbono coloidal de la tinta china.

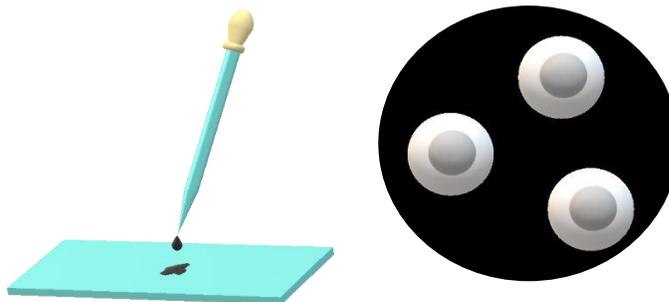


Figura 105. Esquema de la técnica de la tinción de tinta china (Autoría propia) **.

El procedimiento empleado para la tinción de tinta china fue establecido mediante ensayo y error, por lo cual en esta tinción se seleccionó una dilución con agua 3:4 para la tinta china, empleando tinta china marca “Azor”, ya que es la que presentó mejores resultados. Además, se compararon técnicas empleadas por diferentes autores, como se muestra en el siguiente cuadro:

** Esquema realizado por los autores.



Tinción de tinta china			
Referencia	Gamazo C, López I, et al.	Rodríguez E, Gamboa M et al.	Arenas R
Técnica de tinción	Tomar una gota de la muestra, colocarla en el portaobjetos y añadir una gota de tinta china que no supere el tamaño de la gota de muestra y mezclar. Colocar cubreobjetos	En el extremo de la lámina colocar una gotita de muestra, agregar una gotita de tinta china y mezclar con el asa. Extender esa mezcla hasta que forme una película delgada.	Colocar una gota de la muestra por examinar en un portaobjetos con una gota de tinta china (dilución de 1:2 con agua destilada) y coloque el cubreobjetos.

Cuadro 11. Comparación de técnicas empleadas para tinta china ^(14,54,68).



3.2.1.2.1.2.2 Procedimiento de la tinción de tinta china

Material	Aparatos y equipo	Reactivos	Cepas
-Asa bacteriológica -Portaobjetos -Cubreobjetos -Goteros para cada reactivo -Tubo de ensayo con tapa -Pipeta Pasteur con bulbo -Encendedor -Mechero Bunsen con manguera -Gradilla	-Microscopio -Cronómetro	-Tinta china marca “Azor” -Solución isotónica -Agua -Aceite de inmersión	- <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)

Cuadro 12. Material, aparatos, equipos, reactivos y cepas empleadas para la tinción de tinta china.



Figura 106. Material necesario para la tinción de tinta china *.



Figura 107. Aparatos y equipo a emplear en la tinción de tinta china *.

* Fotografía tomada por los autores.

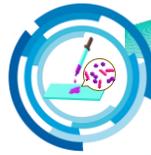


Figura 108. Reactivos para la tinción de tinta china *.

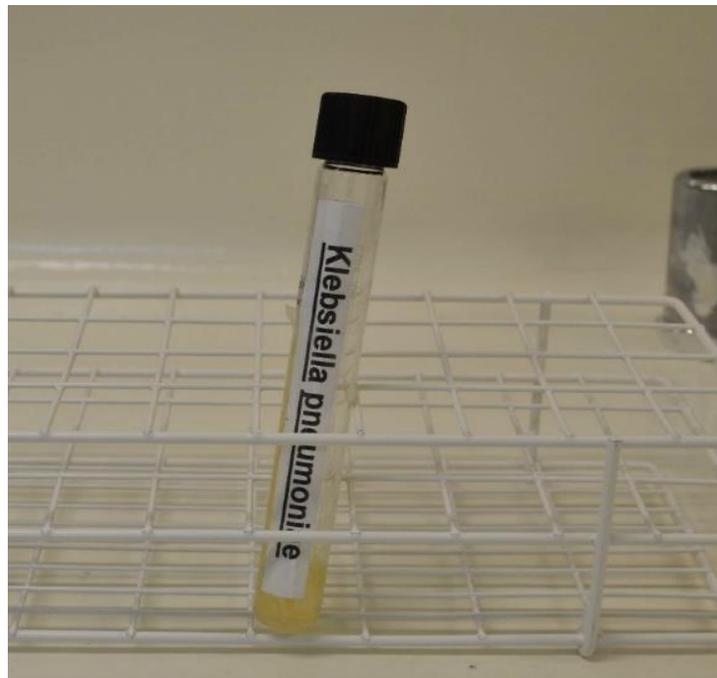
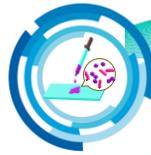


Figura 109. Cepa necesaria para la tinción de tinta china *.

* Fotografía tomada por los autores.



Tinción de tinta china (Modificado de 68)

Preparación del espécimen o muestra

1

Realizar una suspensión de **tinta china con agua**, en una **proporción de 3:4** (figura 110).



Figura 110. Suspensión de tinta china con agua *.

2

Colocar en el portaobjetos una microgota de agua con ayuda del asa bacteriológica (figura 111).

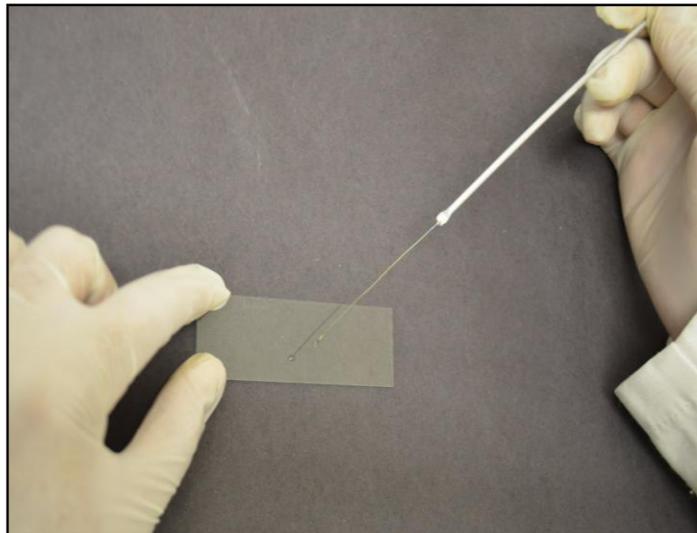
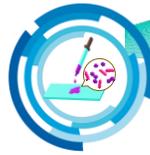


Figura 111. Colocación de microgota *.

* Fotografía tomada por los autores.



3

Realizar una extensión con el material a estudiar (ver página 52) y homogeneizar con ayuda del asa bacteriológica (figura 112).

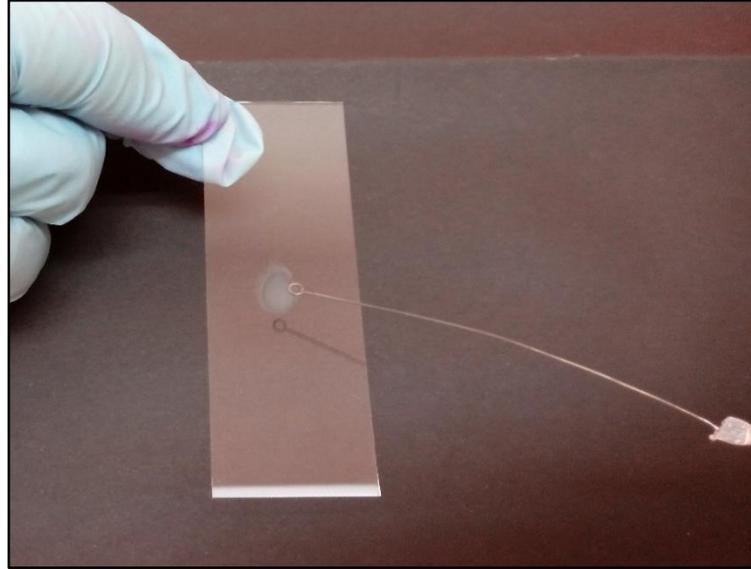


Figura 112. Extensión y homogeneización de la muestra *.

Realización de la tinción

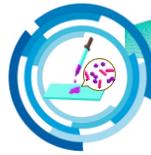
1

Colocar una gota de la suspensión con ayuda de una pipeta Pasteur sobre el portaobjetos que contiene la muestra (figura 113).



Figura 113. Colocación de la suspensión *.

* Fotografía tomada por los autores.



2

Colocar un cubreobjetos, evitando que se formen burbujas de aire (figura 114).

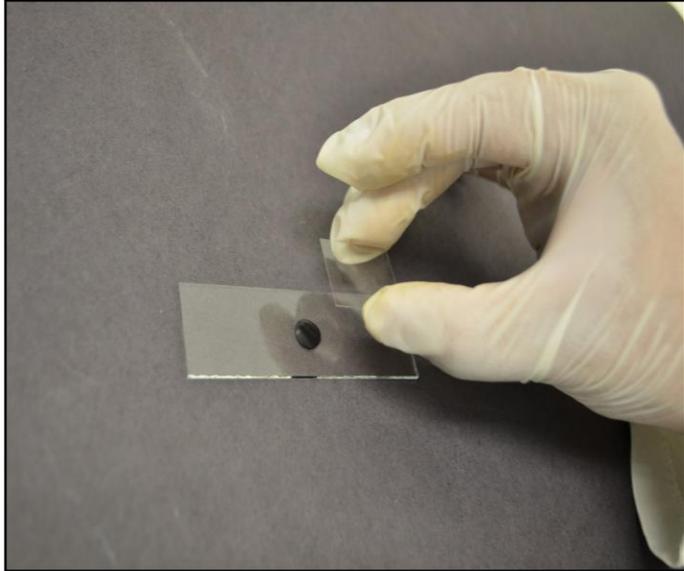


Figura 114. Colocación de cubreobjetos *.

3

Observar al microscopio con objetivos de 40X y 100X (figura 115).

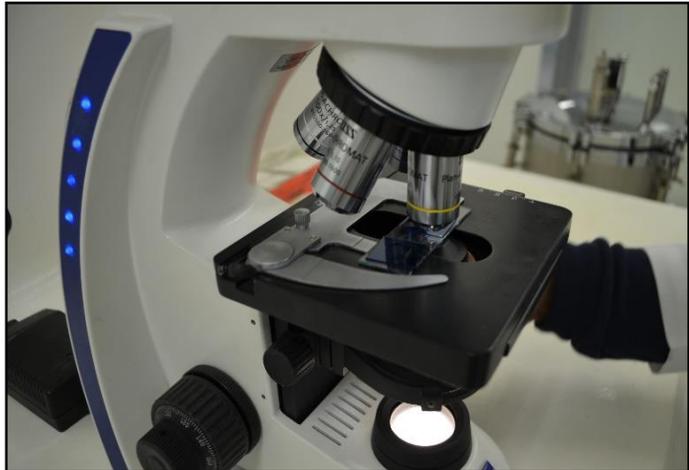


Figura 115. Observación al microscopio *.

Nota 1: En el laboratorio se han observado mejores resultados empleando tinta china marca “Azor”.

* Fotografía tomada por los autores.

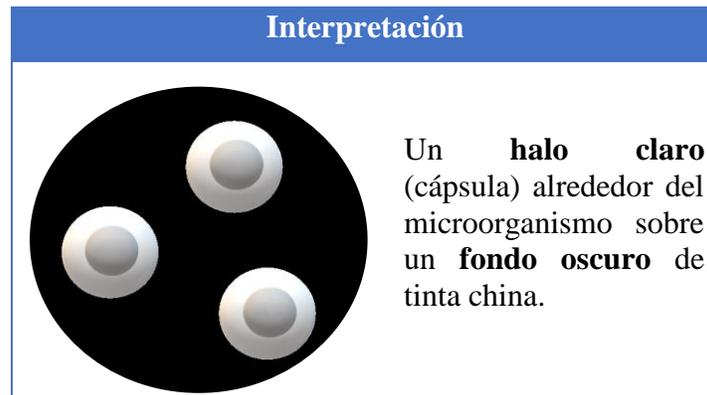
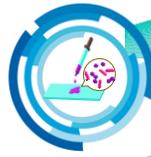


Figura 116. Interpretación de tinción de tinta china **.

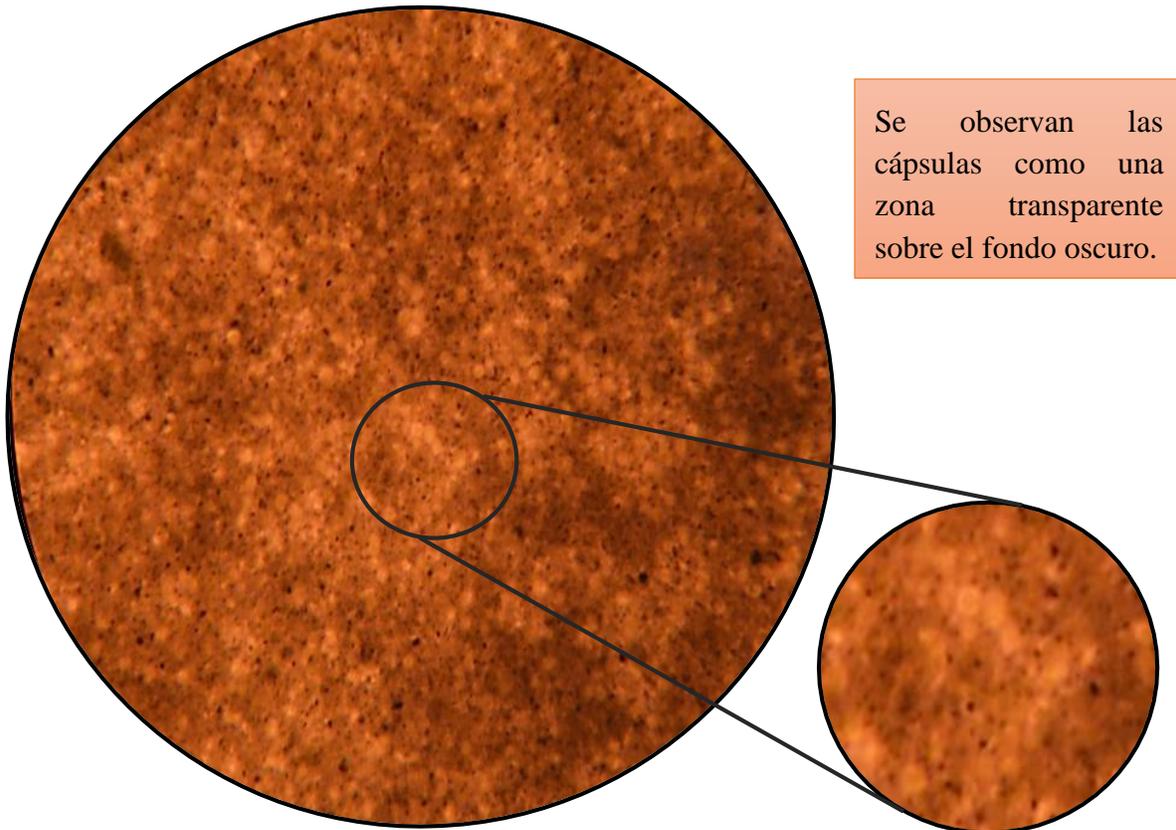


Figura 117. *Klebsiella pneumoniae*, tinción con tinta china, 100X *.

* Fotografía tomada por los autores.

**Esquema realizado por los autores.



Nota 3: Cuando se coloca el cubreobjetos y si se ha realizado una adecuada dilución de la tinta china con agua, ésta debe tener una apariencia uniforme, sin ser tan oscura pero tampoco tan clara. Para ello, en la figura 118, se realizó una comparación de las formas correcta e incorrectas de preparar la muestra.

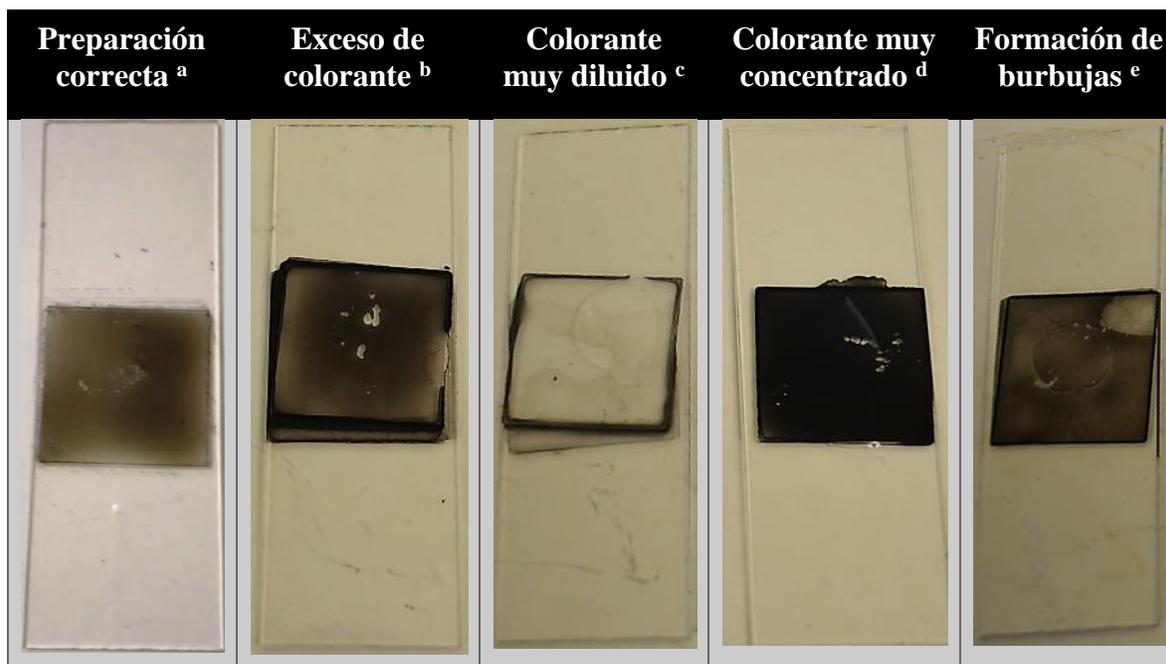


Figura 118. Posibles errores que se pueden presentar en las preparaciones al realizar la tinción con tinta china *.

- Preparación con la cantidad adecuada de colorante (tinta china) para observar las cápsulas.
- El exceso de colorante puede causar el desbordamiento del colorante en el portaobjetos y también un exceso de colorante en la preparación, lo que puede dificultar la observación de las cápsulas.
- El uso de un colorante muy diluido evitará la correcta tinción de la preparación.
- El uso de un colorante muy concentrado evitará el paso de la luz en el microscopio y en consecuencia se observará únicamente un campo oscuro.
- La formación de burbujas podría evitar que el colorante se homogeneice en la preparación e incluso podría interferir con la visualización de las cápsulas en algunos campos que sean observados.

Nota 4: Para desechar el material biológico empleado durante el procedimiento deben seguirse las indicaciones marcadas en el apartado de “Fase post-analítica”, en la página 166.

Nota 5: Algunas limitaciones para la utilización de esta técnica de tinción pueden observarse en la página 197 (anexo 6.3.5).

* Fotografía tomada por los autores.



3.2.1.2.1.3 Tinción de rojo Congo

3.2.1.2.1.3.1 Fundamento de la tinción de rojo Congo

La técnica de la tinción negativa como lo es la tinción de rojo Congo y de tinta china, emplea una solución colorante en la cual el cromógeno es ácido y posee una carga negativa (un cromógeno ácido cede un ión hidrógeno, lo cual lo deja con una carga negativa). La carga negativa en la superficie bacteriana repele el cromógeno cargado negativamente por lo que la célula permanece sin teñir contra un fondo coloreado ⁽³⁵⁾.

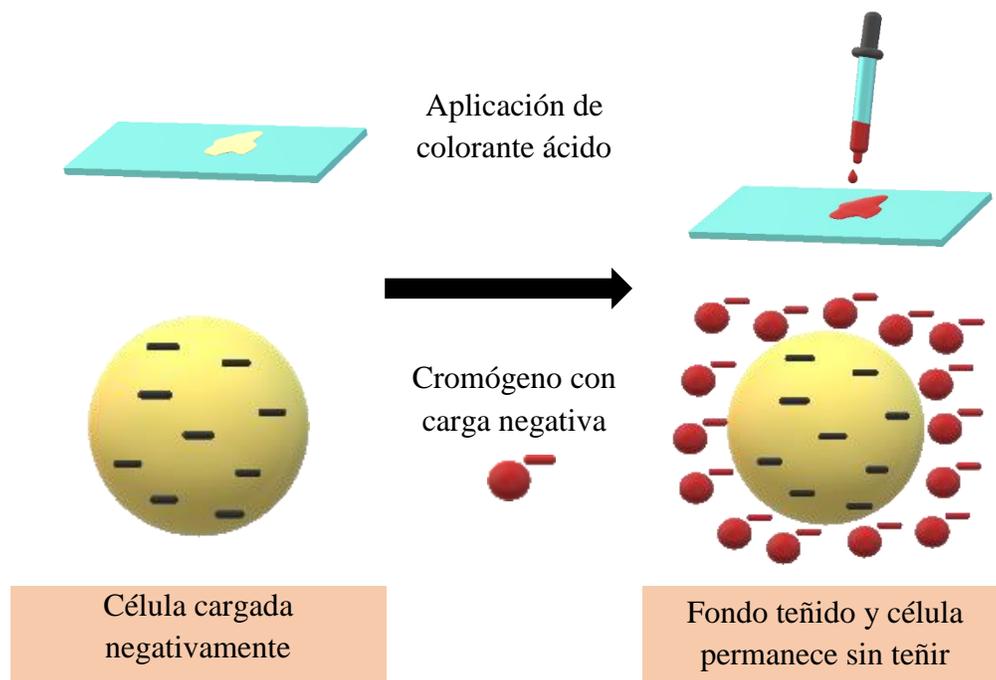


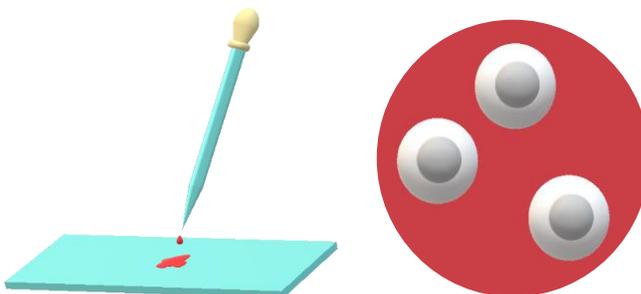
Figura 119. Tinción negativa con colorante ácido (Modificado de 35).

A diferencia de la tinción de tinta china, en la tinción de rojo Congo se emplean dos reactivos, uno de ellos, el rojo Congo y el segundo es un mordente de cápsula. Dicho colorante penetrará el cuerpo del bacilo sin lograr teñir la cápsula, por lo que se observará en el microscopio como una zona de halo transparente rodeado de color rojo del bacilo.



1 Colorante: Rojo Congo

El colorante no tiñe a los microorganismos y la cápsula desplaza a las partículas del colorante.



2 Mordente: Mordente de cápsula

El colorante se fija con el mordente y el fondo se tiñe de color **rojo**.

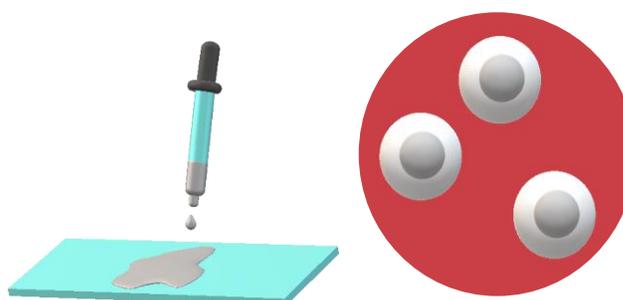


Figura 120. Esquema de la técnica de la tinción de rojo Congo **. Nota: entre cada paso se realizan lavados con agua.

En el laboratorio se seleccionaron los mejores tiempos para la tinción, en este caso, fueron necesarios 3 min para el mordente de cápsula y la extensión de la cepa fue realizada con el reactivo de rojo Congo. De igual manera, como en las tinciones anteriores, se realizó una comparación con diversos autores, como se muestra en el siguiente cuadro:

Tinción de rojo Congo		
Referencia	García A, Zamudio MM	Troya S
Rojo Congo	Una gota y hacer suspensión con la cepa	Una gota y hacer suspensión con la cepa
Fijación	Si	No
Mordente de cápsula	3 min	1 min

Cuadro 13. Tiempos empleados para cada reactivo por diferentes autores para la tinción de rojo Congo (Modificado de 69, 70).

** Esquema realizado por los autores.



3.2.1.2.1.3.2 Procedimiento de la tinción de rojo Congo

Material	Aparatos y equipo	Reactivos	Cepas
-Asa bacteriológica	-Microscopio	-Rojo Congo	<i>-Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)
-Portaobjetos	-Cronómetro	-Agua	
-Mechero Bunsen con manguera		-Mordente de cápsula	
-Encendedor			
-Piseta			
-Goteros para cada reactivo			
-Gradilla			

Cuadro 14. Material, aparatos, equipos, reactivos y cepas empleadas para la tinción de rojo Congo.



Figura 121. Material necesario para la tinción de rojo Congo *.



Figura 122. Aparatos y equipo a emplear en la tinción de rojo Congo *.

* Fotografía tomada por los autores.



Figura 123. Reactivos a emplear en la tinción de rojo Congo *.

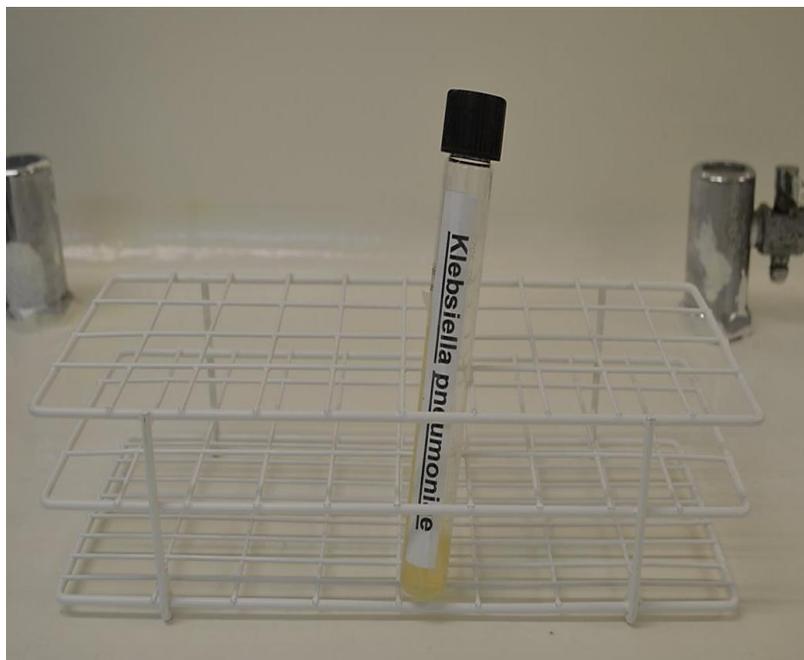


Figura 124. Cepa a emplear en la tinción de rojo Congo *.

* Fotografía tomada por los autores.



Tinción de rojo Congo (Modificado de 69)

Preparación del espécimen o muestra

1

Colocar en el portaobjetos una microgota de **rojo Congo** con ayuda del asa bacteriológica (figura 125).

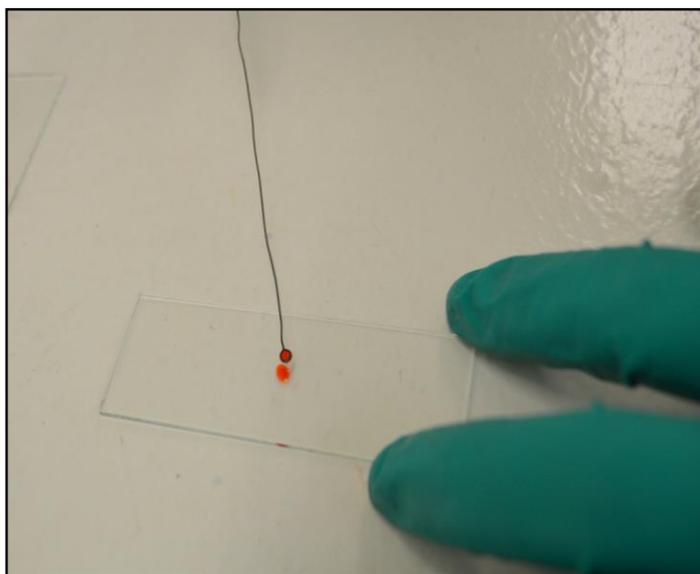


Figura 125. Colocación de microgota de rojo Congo *.

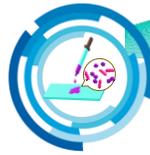
2

Realizar una extensión con el material a estudiar (ver página 52) y homogeneizar con ayuda del asa bacteriológica (figura 126).



Figura 126. Extensión y homogeneización de la muestra *.

* Fotografía tomada por los autores.



Realización de la tinción

4

Cubrir el frotis con **mordente de cápsula** por **3 min** (figura 129).



Figura 129. Aplicación del mordente de cápsula *.

5

Lavar con agua y dejar secar al aire (figura 130).

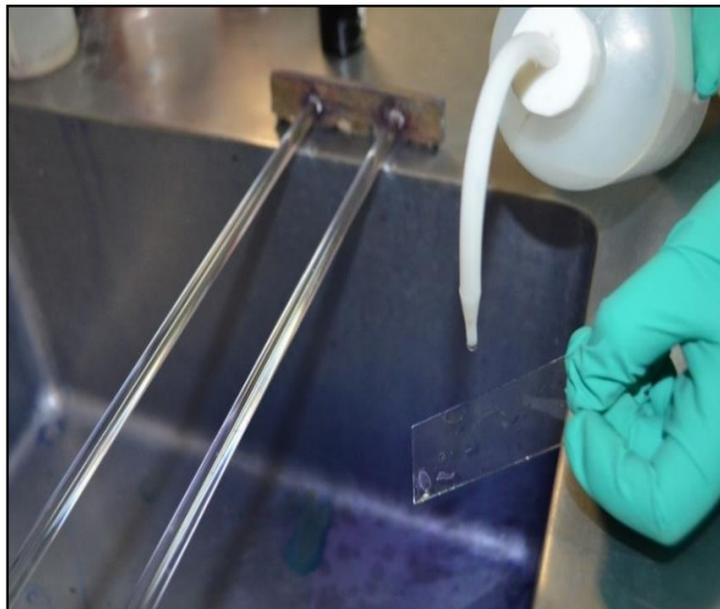
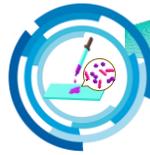


Figura 130. Lavado de la preparación *.

* Fotografía tomada por los autores.



6

Observar al microscopio con objetivos de 40X y 100X (figura 131).

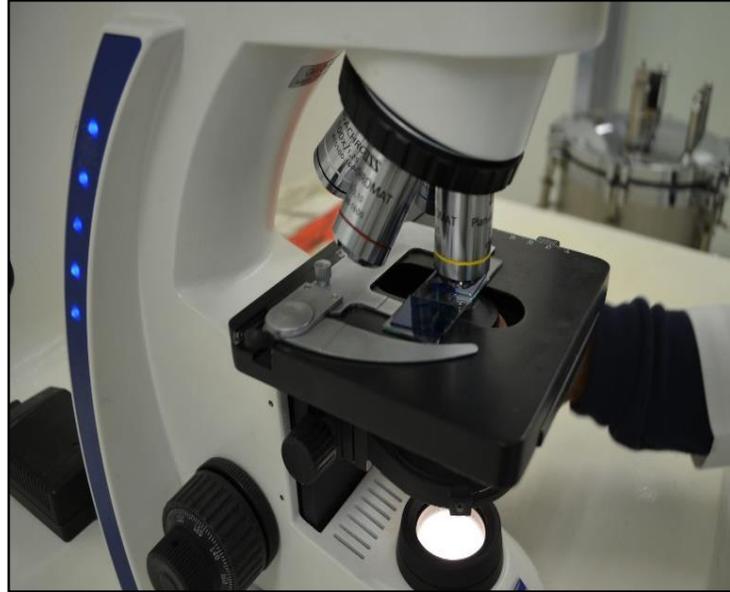
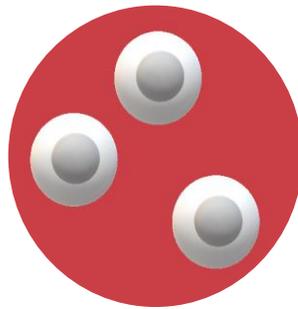


Figura 131. Observación al microscopio *.

Interpretación



Aparece un **halo claro** (cápsula) alrededor del microorganismo sobre un **fondo rojo** (colorante Rojo Congo)

Figura 132. Interpretación de tinción de rojo Congo **.

Nota: Para desechar el material biológico empleado durante el procedimiento deben seguirse las indicaciones marcadas en el apartado de “Fase post-analítica”, en la página 166.

* Fotografía tomada por los autores.

**Esquema realizado por los autores.

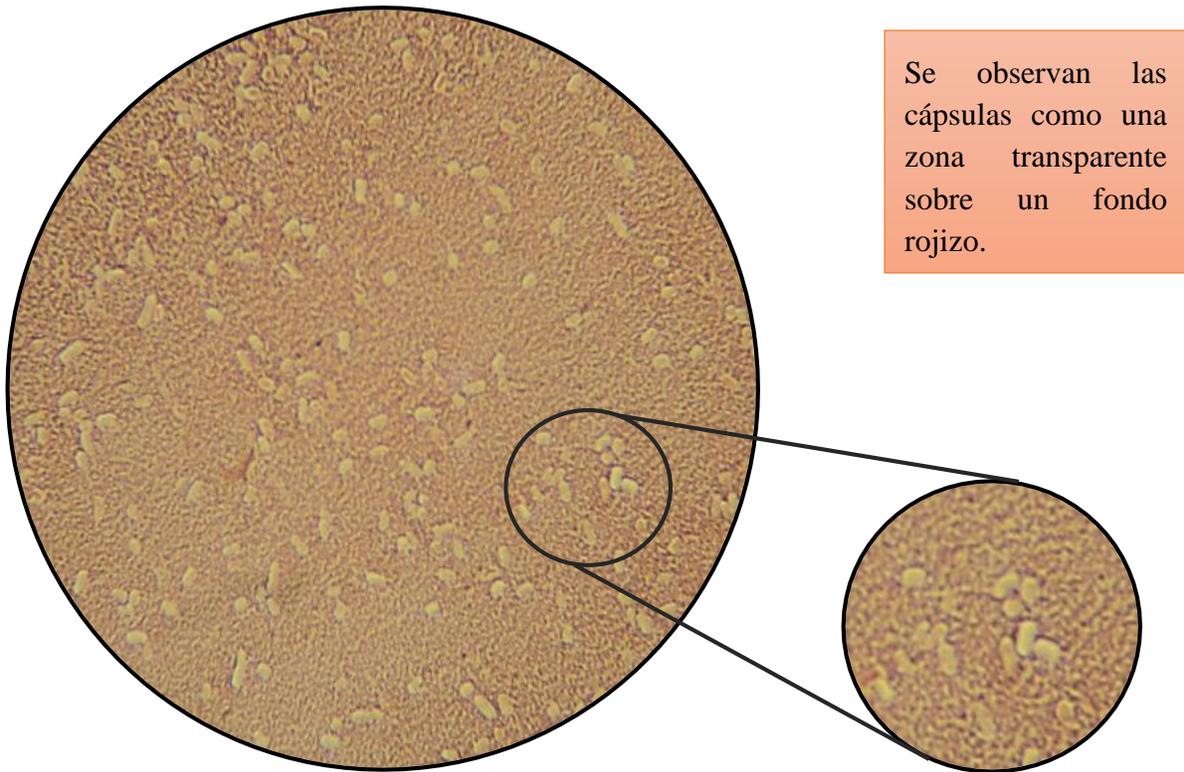
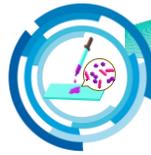


Figura 133. *Klebsiella pneumoniae*, tinción de rojo Congo, 100X *.

* Fotografía tomada por los autores.



3.2.1.2.2 Tinción de esporas

Las endosporas son estructuras esféricas u ovaladas formadas dentro de ciertas especies bacterianas que representan un estado latente o “de reposo” en el ciclo de crecimiento del microorganismo. Entre las bacterias de importancia clínica, las endosporas son formadas por bacilos Gram positivos aerobios pertenecientes al género *Bacillus* y otros géneros relacionados, y por los Gram positivos anaerobios del género *Clostridium*. Las endosporas se forman en respuesta a la carencia nutricional dentro de la célula bacteriana vegetativa. Son muy resistentes a los efectos dañinos del calor, la desecación, la presión y muchos desinfectantes químicos, lo cual les permite sobrevivir en este estado por largos periodos de tiempo. La total ausencia de ATP dentro de las endoesporas es un indicativo de cuán inactivas están. Son necesarias temperaturas de esterilización (120 °C durante 15-20 minutos) para matarlas ^(35, 50).

La resistencia de las endoesporas es debida a la combinación de factores, incluyendo una cubierta exterior hecha de la proteína queratina, su estado deshidratado, proteínas protectoras de ADN y otras adaptaciones. Cuando las condiciones son favorables de nuevo, las endoesporas germinan en células activas metabólicamente ⁽³⁵⁾.

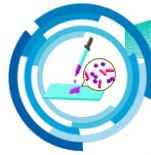
El proceso de formación de endosporas en el interior de una célula vegetativa (progenitora) tarda varias horas y se conoce con los nombres de esporulación o esporogénesis. La maduración de la endospora se acompaña de la ruptura (lisis) de la pared celular de la célula vegetativa, la muerte de la célula y la liberación de la endospora ^(50, 40).

El tamaño, la forma y ubicación de las endosporas es útil para la caracterización e identificación de ciertas especies. Pueden ser esféricas, subesféricas y ovals. La endoespora ocupa una posición característica dentro de la célula y pueden diferir en su ubicación dentro de la célula, pudiendo ser terminal (localizada en un extremo), subterminal (localizada cerca de un extremo) o central (en el centro de la célula vegetativa) y pueden abultar la célula o no (el diámetro de las endoesporas puede ser igual, menor o mayor que el de la célula vegetativa) ^(40, 50, 71).

3.2.1.2.2.1 Tinción de Schaeffer Fulton

3.2.1.2.2.1.1 Fundamento de la tinción de Schaeffer Fulton

Las endoesporas son formas de resistencia altamente deshidratadas y con una serie de cubiertas muy poco permeables, esto hace que sean difíciles de teñir, excepto si se calienta la preparación para permeabilizarlas ⁽⁵⁴⁾.



En la tinción de Schaeffer Fulton el colorante primario (verde de malaquita) se introduce en la espora mediante el calentamiento a emisión de vapores de la preparación. El verde de malaquita es soluble en agua y tiene una baja afinidad por el material celular, por lo que las células vegetativas y las células madre de esporas pueden decolorarse con agua y contrateñirse con safranina (colorante de contraste) por la cual si tienen afinidad ⁽³⁵⁾.

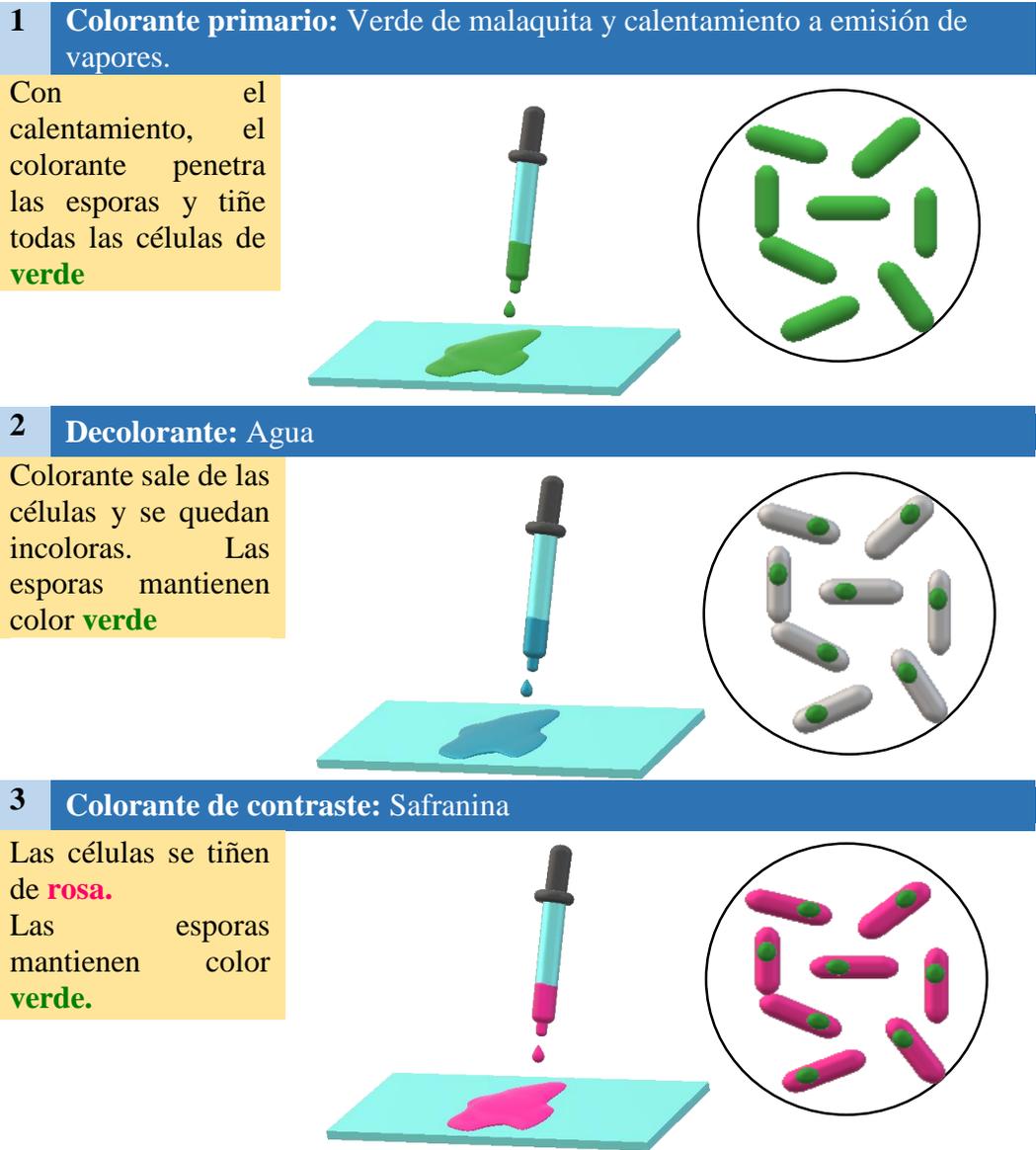


Figura 134. Esquema de la técnica de la tinción de Schaeffer Fulton **.

De igual manera, como sucedió con las tinciones anteriores, se realizó una comparación con diferentes autores para seleccionar los mejores tiempos, o de ser necesarios modificarlos de

** Esquema realizado por los autores.



acuerdo a las condiciones del laboratorio en que se trabaja y a los reactivos con los que se cuenta. Esta comparación se muestra en el siguiente cuadro:

Tinción de Schaeffer Fulton			
Referencia	Rodríguez E, Gamboa M, et al.	Delgado A, Prieto S, et al.	Olivas E
Verde de malaquita(a emisión de vapores)	10 min (sin que la preparación se seque o ebulle) y dejar enfriar preparación por 1 o 2 min	8 min	5 min
Lavado	30 s	Sin especificar	Sin especificar
Safranina	30 s	30 s	1 min

Cuadro 15. Tiempos empleados para cada reactivo por diferentes autores para la tinción de Schaeffer Fulton ^(30,53,54).

3.2.1.2.2.1.2 Microorganismo empleado o de importancia

- *Bacillus cereus*

El género *Bacillus*, consiste en bacilos rectos Gram positivos que miden de entre 2-9 μm , aerobios estrictos o anaerobios facultativos, en su mayoría móviles, se agrupan en diplo o en cadenas de diferente longitud y forman endoesporas. Los miembros del género *Bacillus*, son fáciles de aislar del ántrax o el aire del suelo y se encuentran entre los organismos más comunes que aparecen cuando las muestras del suelo se rayan en placas de agar que contienen componentes nutritivos. La única especie altamente patógena para el hombre es el *Bacillus anthracis*, que produce el carbunco, enfermedad que afecta primariamente al ganado doméstico ^(24, 12, 52).

Bacillus cereus es un organismo grande, comprendido entre 3-7 μm , no presenta cápsula y pueden disponerse en cadenas cortas o largas, su metabolismo es aerobio, pero puede ser anaerobio facultativo. Es responsable en muchas ocasiones de trastornos gastrointestinales y también ha sido asociado a cuadros graves como abscesos pulmonares, infecciones oculares, meningitis, osteomielitis, endocarditis e infecciones neonatales graves ^(24, 12, 52).



3.2.1.2.2.1.3 Procedimiento de la tinción de Schaeffer Fulton

Material	Aparatos y equipo	Reactivos	Cepas
-Asa bacteriológica -Portaobjetos -Mechero Bunsen con manguera -Encendedor -Piseta -Puente de vidrio -Tripié -Gradilla -Pinzas	-Microscopio -Cronómetro	-Verde de malaquita -Safranina -Agua -Aceite de inmersión	- <i>Bacillus cereus</i>

Cuadro 16. Material, aparatos, equipos, reactivos y cepas empleadas para la tinción de Schaeffer Fulton.



Figura 135. Material necesario para la tinción de Schaeffer Fulton *.



Figura 136. Aparatos y equipo a emplear en la tinción de Schaeffer Fulton *.

* Fotografía tomada por los autores.

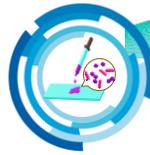


Figura 137. Reactivos a emplear en la tinción de Schaeffer Fulton *.



Figura 138. Cepa a emplear en la tinción de Schaeffer Fulton *.

* Fotografía tomada por los autores.



Tinción de Schaeffer Fulton (Modificado de 54)

Preparación del espécimen o muestra

1

Colocar en el portaobjetos una microgota de agua con ayuda del asa bacteriológica (figura 139).

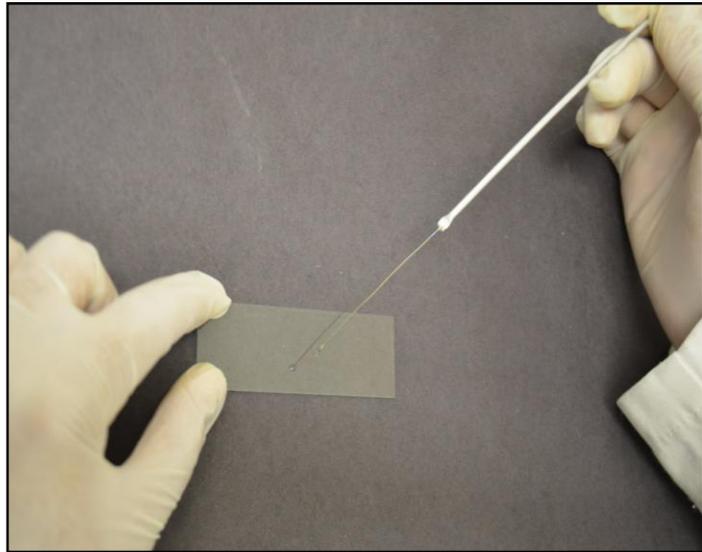


Figura 139. Colocación de microgota *.

2

Realizar una extensión con el material a estudiar (ver página 52) y homogeneizar con ayuda del asa bacteriológica (figura 140).

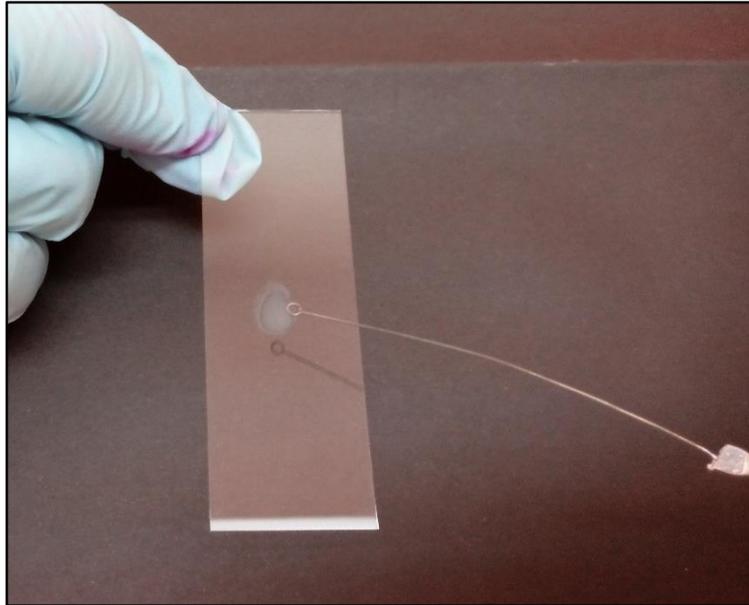
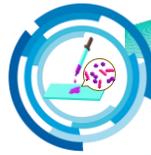


Figura 140. Extensión y homogeneización de la muestra *.

* Fotografía tomada por los autores.



3

Fijar el frotis con calor pasando el portaobjetos de 3 a 4 veces por encima de la llama del mechero Bunsen (figura 141), cuidando que no se exceda la temperatura de exposición al calor (figura 142), empleando como referencia que el calor del portaobjetos pueda ser tolerable para la parte interna de la mano.

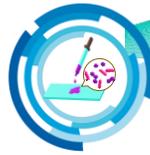


Figura 141. Fijación de la preparación *.



Figura 142. Cuidado de la temperatura de fijación *.

* Fotografía tomada por los autores.



Realización de la tinción

4

Colocar las gotas necesarias de **verde de malaquita** para cubrir la muestra y calentar a **emisión de vapores con el calor directo** del mechero bunsen por **15 min.** La aplicación del calor debe ser por 3 s y alejando la flama del portaobjetos con la muestra por 30 s (figura 143).



Figura 143. Calentamiento a emisión de calor directo con mechero Bunsen, empleando verde de malaquita *.

5

Lavar la preparación con agua (figura 144).

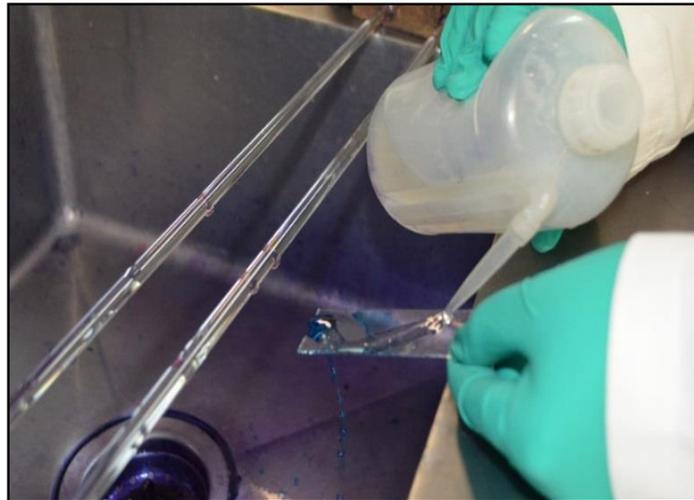
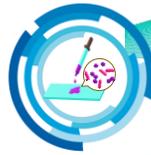


Figura 144. Lavado de la preparación *.

* Fotografía tomada por los autores.



6

Colocar las gotas necesarias de **safranina** durante **3 min** (figura 145).



Figura 145. Aplicación de safranina *.

7

Lavar con agua (figura 146).

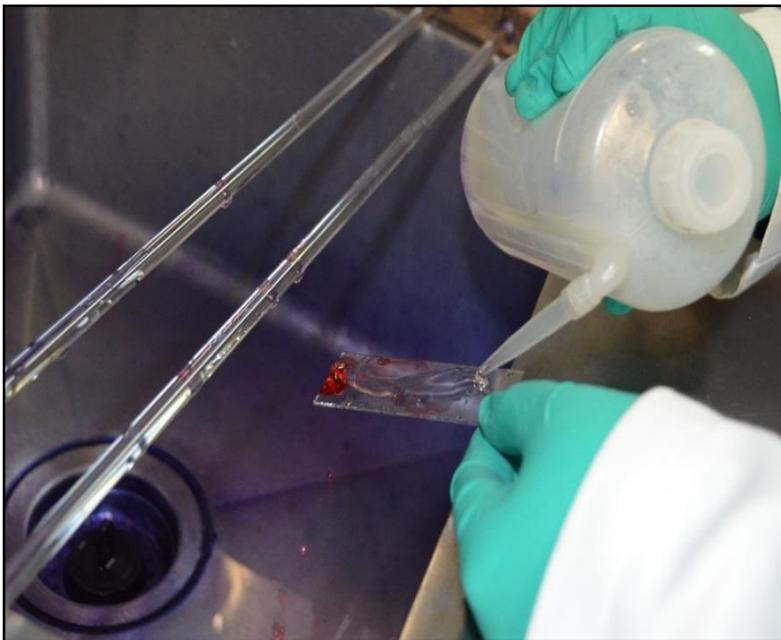
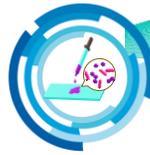


Figura 146. Lavado de la preparación *.

* Fotografía tomada por los autores.



8

Dejar secar al aire y observar al microscopio a 40X y 100X (figura 147).



Figura 147. Observación al microscopio *.

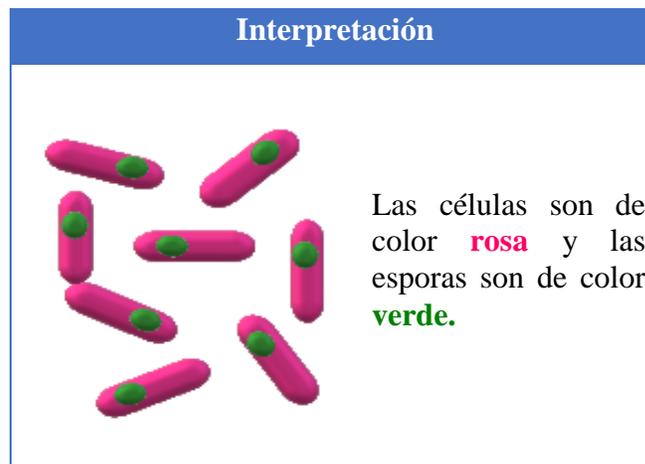
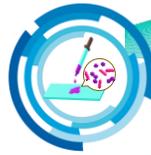


Figura 148. Interpretación de tinción de Shaeffer Fulton **.

Nota 1: En el paso número uno de la “realización de la tinción” es necesario y muy importante no dejar secar el colorante verde de malaquita sobre la muestra, por ello deben agregarse constantemente gotas del colorante.

* Fotografía tomada por los autores.

** Esquema realizado por los autores.



Nota 2: Para desechar el material biológico empleado durante el procedimiento de tinción, los portaobjetos deben desecharse directamente en el contenedor rojo rígido, sin previa inactivación y la cepa deberá esterilizarse en autoclave y desechar a la basura común, tal como se indica en el apartado de “post-analítica”, en la página 166.

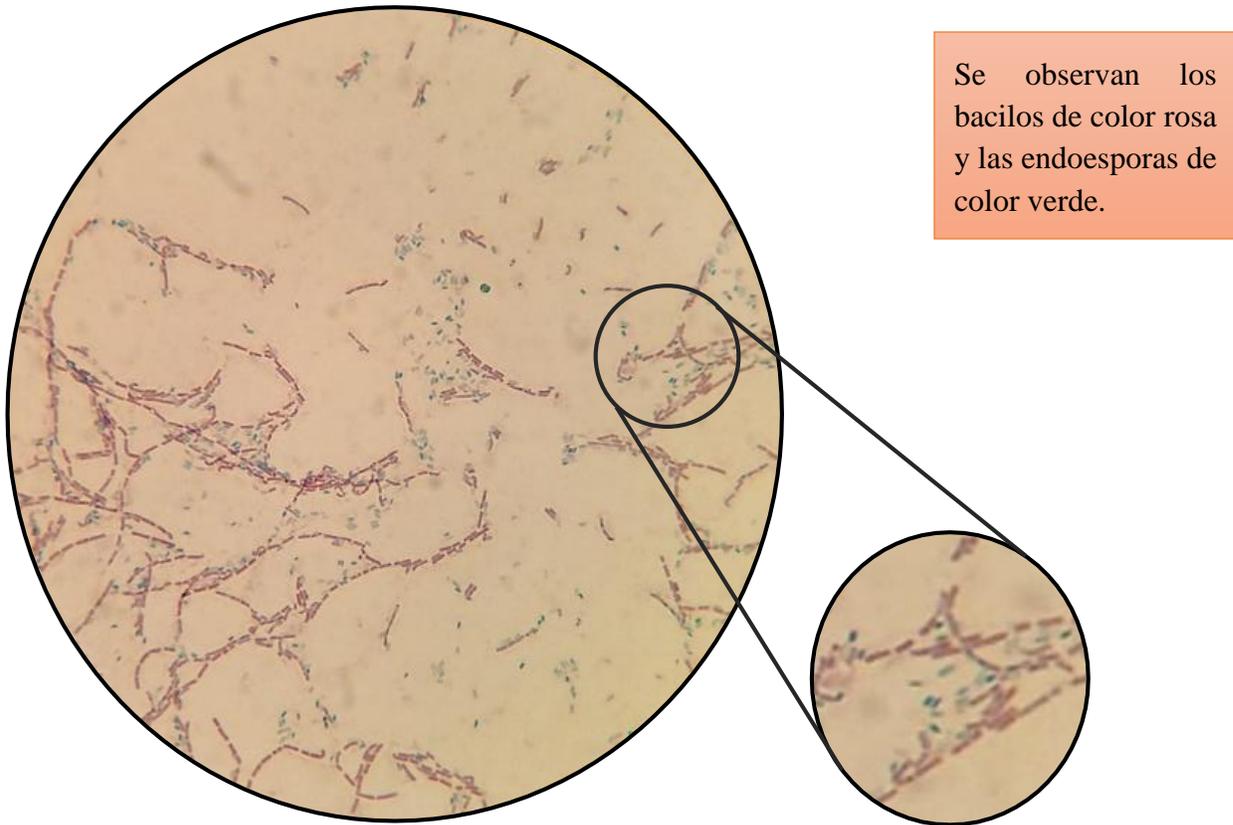


Figura 149. *Bacillus cereus*, tinción de esporas de Schaeffer Fulton, 100X *.

Nota 3: La localización y tamaño de la espora varía con la especie bacteriana y generalmente estas características son de valor para su identificación.

* Fotografía tomada por los autores.



3.2.1.2.3 Tinción de gránulos metacromáticos

Muchas bacterias, cuando crecen bajo determinadas condiciones de cultivo, son capaces de acumular dentro del citoplasma depósitos de materiales de reserva que se denominan inclusiones. Las inclusiones son estructuras formadas por materia particulada y nutrientes disueltos y se describen como un conjunto de elementos sin estructura uniforme. Las células pueden acumular ciertos nutrientes en condiciones favorables para luego utilizarlos en condiciones adversas. Algunas inclusiones son comunes a una amplia diversidad de bacterias mientras que otras sólo se encuentran en una pequeña cantidad de especies y en consecuencia facilitan su identificación. Los gránulos metacromáticos son un ejemplo de estas inclusiones; constituyen acumulaciones de polifosfato y se conocen también como gránulos de volutina o cuerpos de Babés-Ernst. La volutina representa una reserva de fosfato inorgánico (polifosfato) que la célula puede utilizar para sintetizar ATP ^(40, 71).

A continuación, se muestran algunas de las características más relevantes del microorganismo que se observará posteriormente al microscopio.

3.2.1.2.3.1 Microorganismo empleado o de importancia

- *Corynebacterium xerosis*

El género *Corynebacterium*, está compuesto por un grupo de bacilos Gram positivos inmóviles, presentan un tamaño muy pequeño (1-6 μm), aerobios, no móviles, no esporulados, que frecuentemente se agrupan en empalizadas originando formas geométricas parecidas a las letras chinas, poseen extremos abultados en forma de maza y se tiñen de forma irregular. Los miembros del género *Corynebacterium* están muy extendidos: algunos son habitantes comunes del suelo, otros son agentes causales de las plantas y otros son organismos que viven con o son patógenos para los seres humanos y animales ^(25, 12, 52).

La especie más importante es *Corynebacterium diphtheriae*, aunque existen otras que también son patógenas para el hombre. *C. xerosis* es una de las especies de este género que fundamentalmente se comportan como oportunistas pueden provocar algún efecto patógeno en un momento dado ^(25, 12, 52).

3.2.1.2.3.2 Tinción de Albert

3.2.1.2.3.2.1 Fundamento de la tinción de Albert

Los gránulos metacromáticos son comunes en corinebacterias, espirilos y bacilos lácticos y su presencia se utiliza en la identificación de esas bacterias. Estos gránulos tienen una afinidad más fuerte por colorantes básicos (como la fucsina básica, el cristal violeta, el azul de metileno o el verde de malaquita) que el resto de la célula. Estos aparecen de un color



diferente del color original del colorante, fenómeno que se conoce como metacromasia. Cuando se tiñen con el colorante de Albert, que contiene verde malaquita, se observan de un color café verdoso oscuro ^(50, 41).

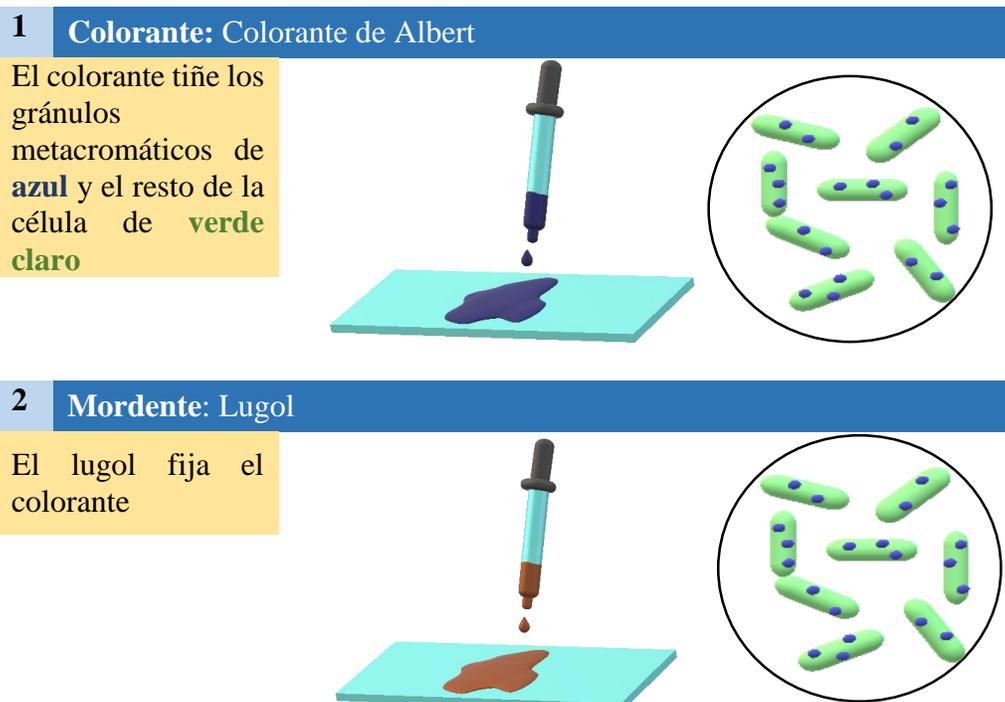


Figura 150. Esquema de la técnica de la tinción de Albert **. Nota: entre cada paso se realizan lavados con agua.

Se realizó una comparación con diferentes autores y se seleccionaron los mejores tiempos y procedimiento para fines de esta tinción:

Tinción de Albert			
Referencia	Rodríguez E, Gamboa M, et al.	Kumar S	Delgado A, Prieto S et al.
Colorante de Albert	1 min	3-5 min	15 min
Lugol	5 min	1 min	1 min

Cuadro 17. Tiempos empleados para cada reactivo por diferentes autores para la tinción de Albert ^(30,54, 72).

** Esquema realizado por los autores.



3.2.1.2.3.2.2 Procedimiento de la tinción de Albert

Material	Aparatos y equipo	Reactivos	Cepas
-Asa bacteriológica	-Microscopio	- Colorante de Albert	- <i>Corynebacterium xerosis</i> (ATCC 1333)
-Portaobjetos	-Cronómetro	-Lugol	
-Mechero Bunsen con manguera		-Agua	
-Encendedor		-Aceite de inmersión	
-Piseta			
-Goteros para cada reactivo			
-Gradilla			

Cuadro 18. Material, aparatos, equipos, reactivos y cepas empleadas para la tinción de Albert.



Figura 151. Material necesario para la tinción de Albert *.



Figura 152. Aparatos y equipo a emplear en la tinción de Albert *.

* Fotografía tomada por los autores.



Figura 153. Reactivos a emplear en la tinción de Albert *.

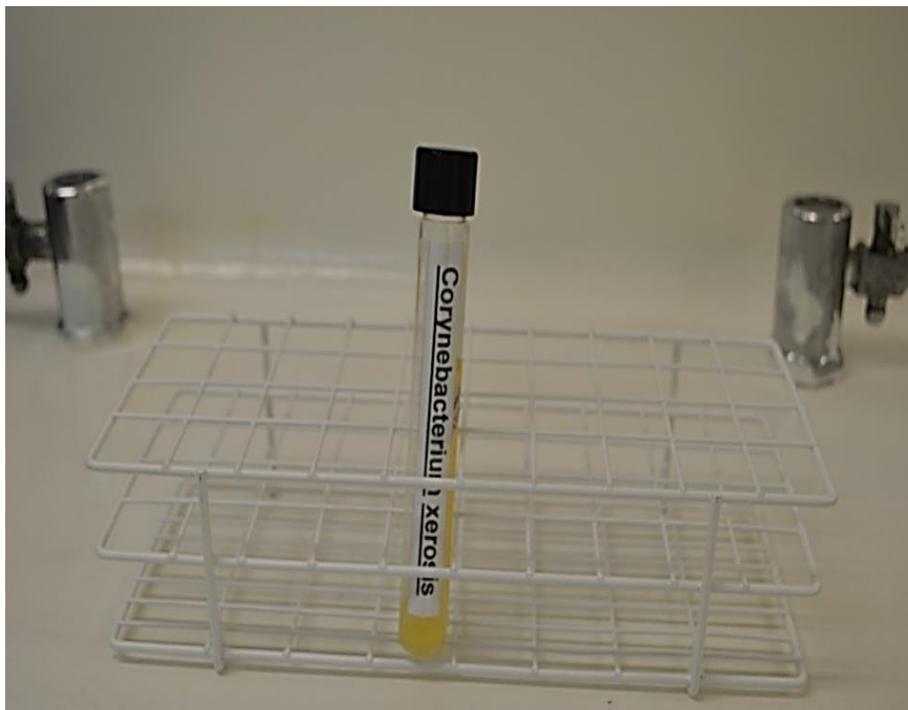
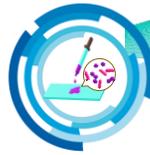


Figura 154. Ceba a emplear en la tinción de Albert *.

* Fotografía tomada por los autores.



Tinción de Albert ⁽⁷²⁾

Preparación del espécimen o muestra

1

Colocar en el portaobjetos una microgota de agua con ayuda del asa bacteriológica (figura 155).

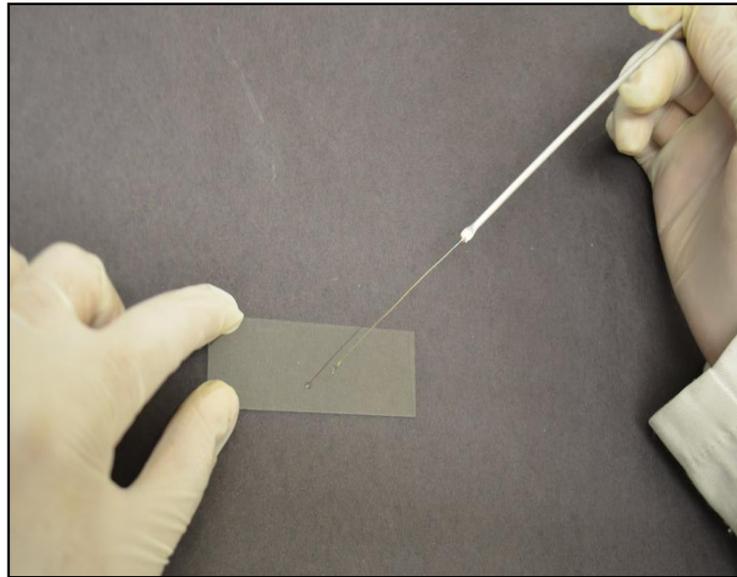


Figura 155. Colocación de microgota *.

2

Realizar una extensión con el material a estudiar (ver página 52) y homogeneizar con ayuda del asa bacteriológica (figura 156).

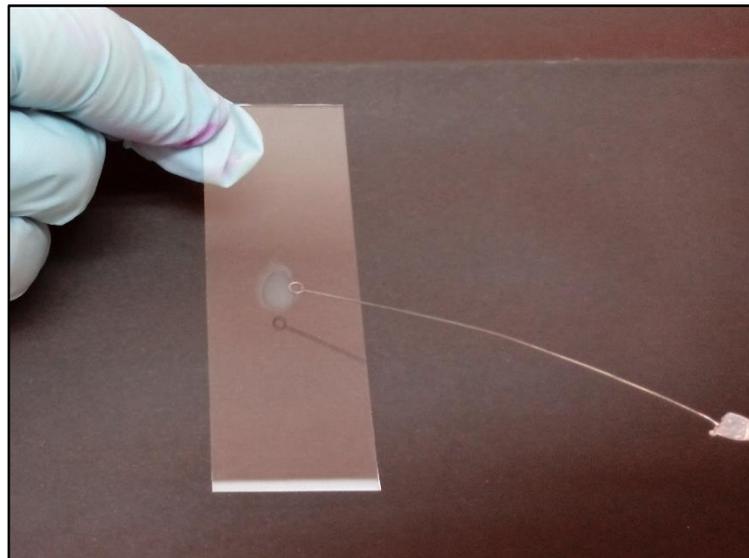
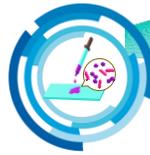


Figura 156. Extensión y homogeneización de la muestra *.

* Fotografía tomada por los autores.



3

Fijar el frotis con calor pasando el portaobjetos de 3 a 4 veces por encima de la llama del mechero Bunsen (figura 157), cuidando que no se exceda la temperatura de exposición al calor (figura 158), empleando como referencia que el calor del portaobjetos pueda ser tolerable para la parte interna de la mano.

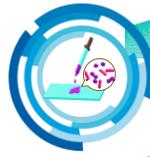


Figura 157. Fijación de la preparación *.



Figura 158. Cuidado de la temperatura de fijación *.

* Fotografía tomada por los autores.



Realización de la tinción

4

Cubrir el extendido con **colorante de Albert** durante **3 min** (figura 159).

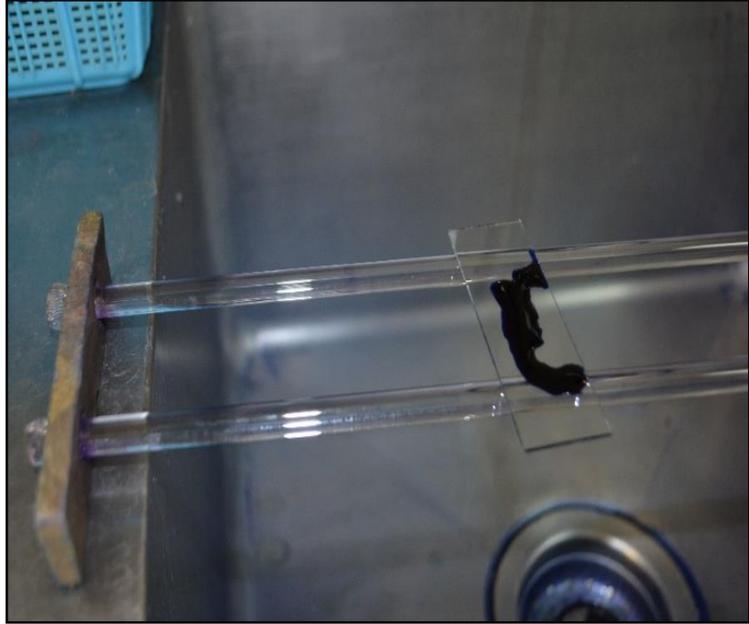


Figura 159. Aplicación de colorante de Albert *.

5

Lavar la preparación con agua (figura 160).

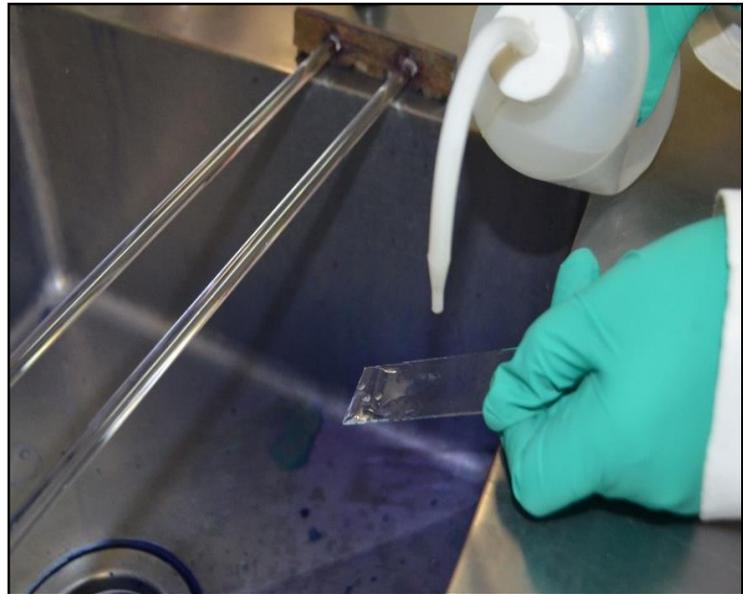
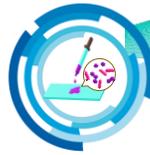


Figura 160. Lavado de la preparación *.

* Fotografía tomada por los autores.



6

Cubrir con **lugol** durante **1 min** (figura 161).



Figura 161. Aplicación de lugol *.

7

Lavar con agua y dejar secar al aire (figura 162).

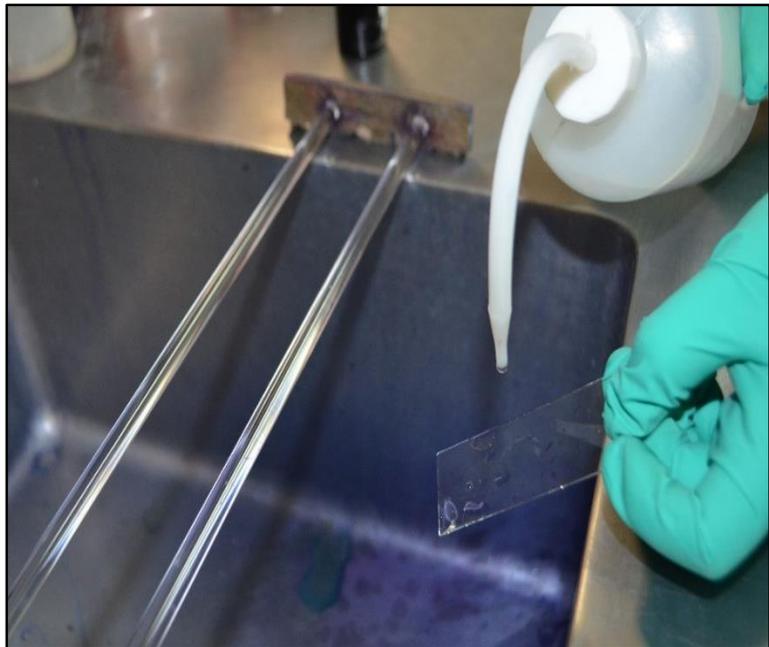
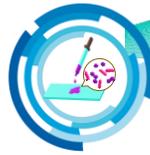


Figura 162. Lavado de la preparación *.

* Fotografía tomada por los autores.



8

Observar al microscopio con objetivos de 40X y 100X (figura 163).



Figura 163. Observación al microscopio *.

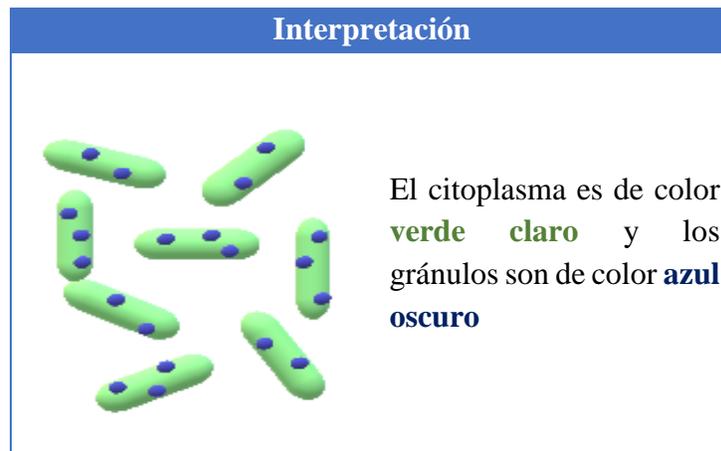


Figura 164. Interpretación de tinción de Albert **.

* Fotografía tomada por los autores.

** Esquema realizado por los autores.

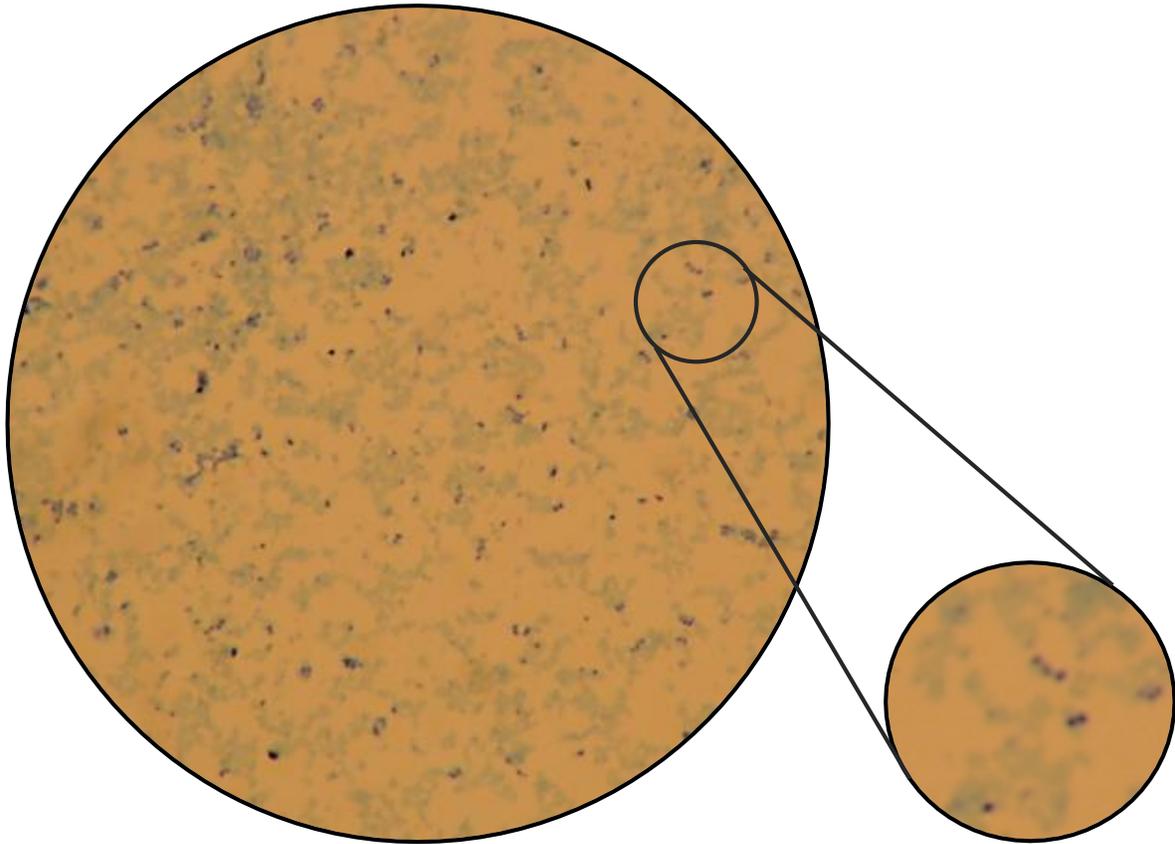
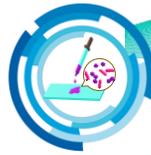


Figura 165. *Corynebacterium xerosis*, tinción de Albert, 100X *.

Nota 1: Para desechar el material biológico empleado durante el procedimiento deben seguirse las indicaciones marcadas en el apartado de “Fase post-analítica”, en la página 166.

Nota 2: Algunas limitaciones para la utilización de esta técnica de tinción pueden observarse en la página 196 (anexo 6.3.3).

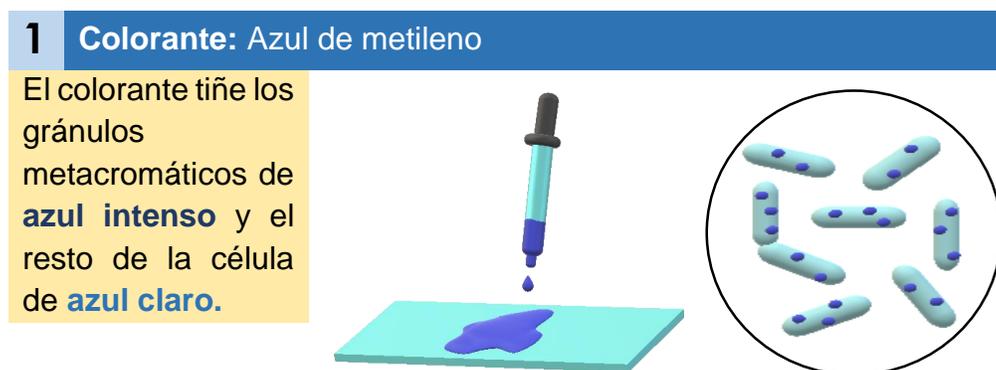
* Fotografía tomada por los autores.



3.2.1.2.3.2 Tinción de Loeffler

3.2.1.2.3.2.1 Fundamento de la tinción de azul de metileno o de Loeffler

Esta tinción también se emplea para la observación de los gránulos metacromáticos en las bacterias, por lo que su fundamento es el mismo que el anterior mencionado, a diferencia de que el colorante que se utiliza es el azul de metileno en lugar del colorante de Albert, por lo que dichos gránulos se observarán de color azul oscuro ⁽¹⁴⁾.



1 Colorante: Azul de metileno

El colorante tiñe los gránulos metacromáticos de **azul intenso** y el resto de la célula de **azul claro**.

Figura 166. Esquema de la técnica de la tinción de Loeffler **. Nota: después del colorante se realiza un lavado con agua.

Como en las tinciones anteriores, se realizó una comparación con diferentes autores para seleccionar los mejores tiempos:

Tinción de Loeffler			
Referencia	Rodríguez E, Gamboa M, et al.	Koneman EW, Allen SD, et al.	Delgado A, Prieto S, et al.
Técnica de tinción	Azul de metileno durante 5 min	Azul de metileno durante 1 min	Azul de metileno durante 3 min

Cuadro 19. Tiempos empleados para cada reactivo por diferentes autores para la tinción de Loeffler ^(30, 50, 54).

El procedimiento y los tiempos empleados para esta tinción que se llevó a cabo en el laboratorio se describen a continuación.

** Esquema realizado por los autores.



3.2.1.2.3.2.2 Procedimiento de la tinción de azul de metileno o de Loeffler

Material	Aparatos y equipo	Reactivos	Cepas
-Asa bacteriológica -Portaobjetos -Mechero Bunsen con manguera -Encendedor -Piseta -Goteros para cada reactivo -Gradilla	-Microscopio -Cronómetro	-Azul de metileno -Agua -Aceite de inmersión	- <i>Corynebacterium xerosis</i> (ATCC 1333)

Cuadro 20. Material, aparatos, equipos, reactivos y cepas empleadas para la tinción de Loeffler.



Figura 167. Material necesario para la tinción de Loeffler*.



Figura 168. Aparatos y equipo a emplear en la tinción de Loeffler*.

* Fotografía tomada por los autores.



Figura 169. Reactivos a emplear en la tinción de Loeffler *.

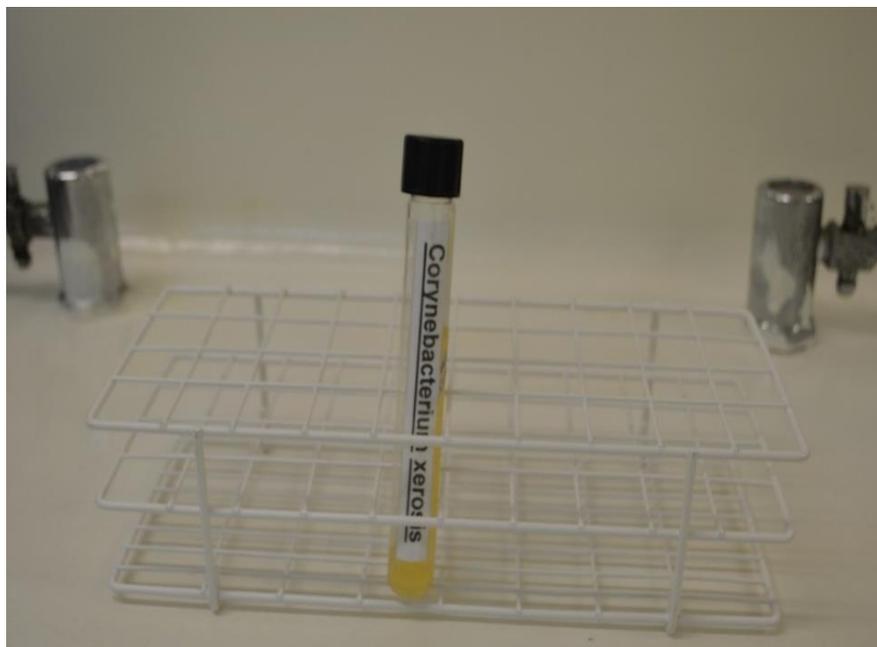


Figura 170. Cepa emplear en la tinción de Loeffler *.

* Fotografía tomada por los autores.



Tinción de Loeffler ⁽²⁴⁾

Preparación del espécimen o muestra

1

Colocar en el portaobjetos una microgota de agua con ayuda del asa bacteriológica (figura 171).

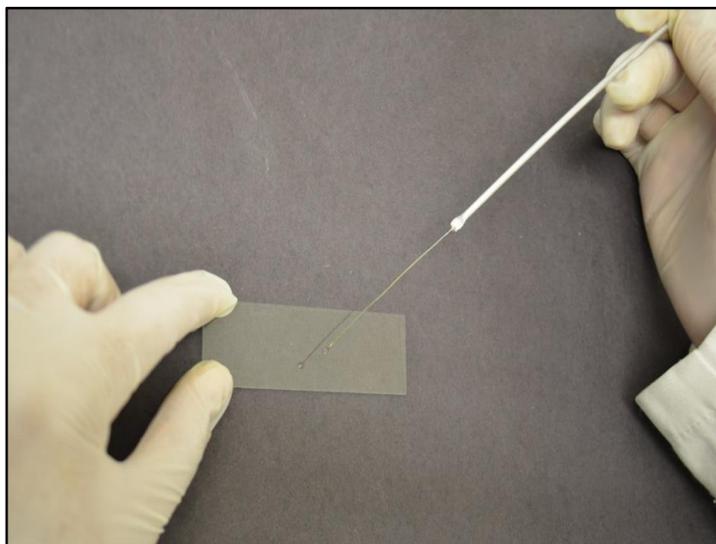


Figura 171. Colocación de microgota *.

2

Realizar una extensión con el material a estudiar (ver página 52) y homogeneizar con ayuda del asa bacteriológica (figura 172).

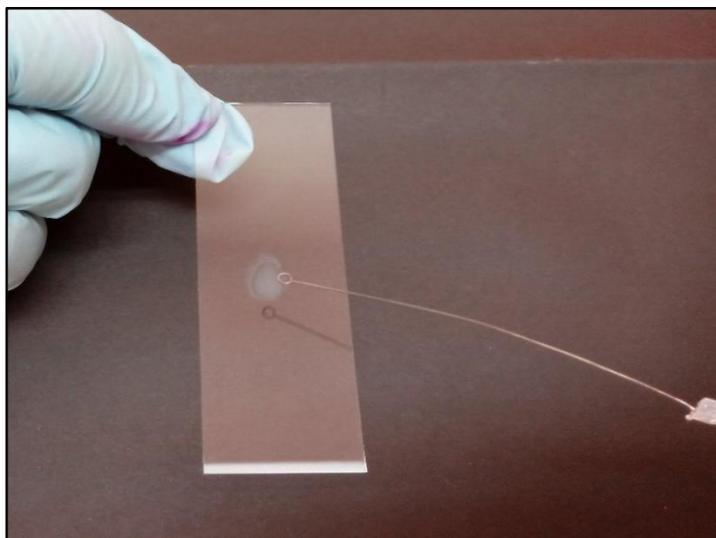


Figura 172. Extensión y homogeneización de la muestra *.

* Fotografía tomada por los autores.



3

Fijar el frotis con calor pasando el portaobjetos de 3 a 4 veces por encima de la llama del mechero Bunsen (figura 173), cuidando que no se exceda la temperatura de exposición al calor (figura 174), empleando como referencia que el calor del portaobjetos pueda ser tolerable para la parte interna de la mano.

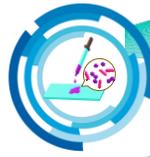


Figura 173. Fijación de la preparación *.



Figura 174. Cuidado de la temperatura de fijación *.

* Fotografía tomada por los autores.



Realización de la tinción

4

Cubrir el frotis con colorante **azul de metileno** durante **3 min** (figura 175).



Figura 175. Aplicación de azul de metileno *.

5

Lavar con agua y dejar secando al aire (figura 176).

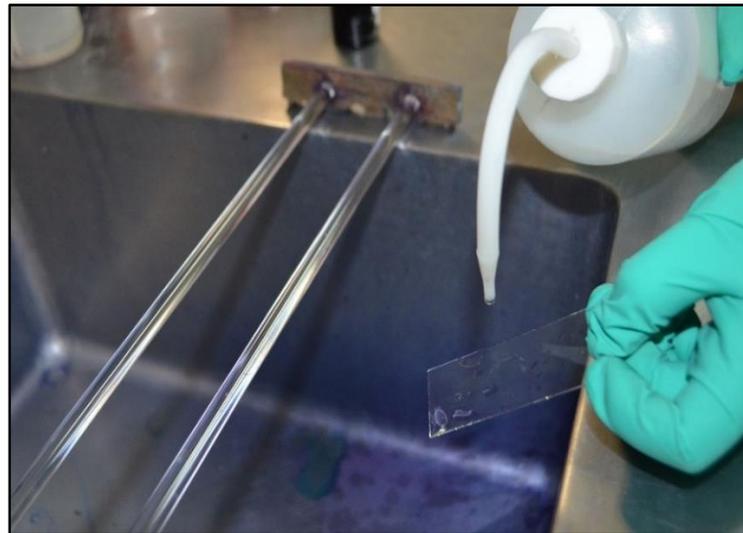


Figura 176. Lavado de la preparación *.

* Fotografía tomada por los autores.



6

Observar al microscopio con objetivos de 40X y 100X (figura 177).

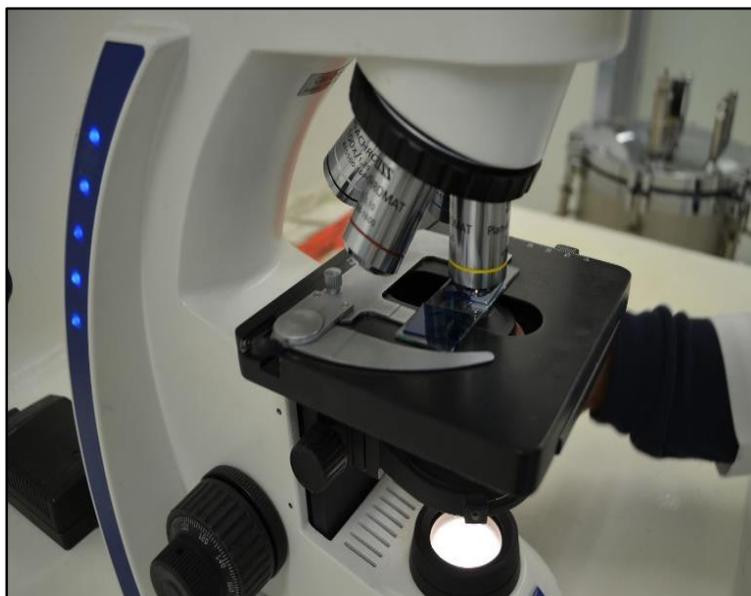


Figura 177. Observación al microscopio *.

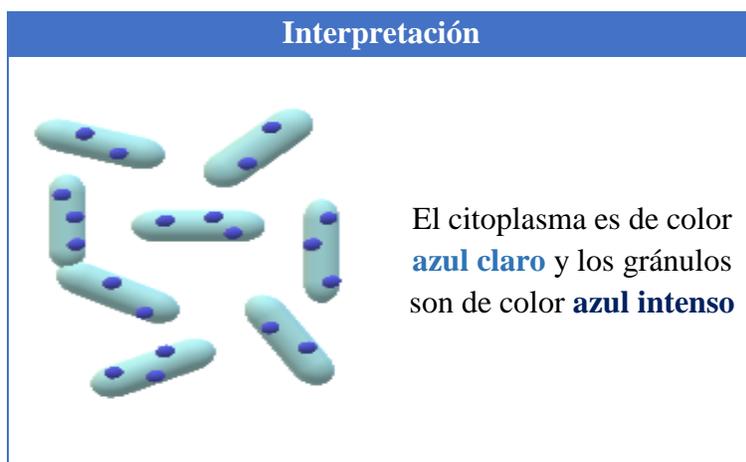


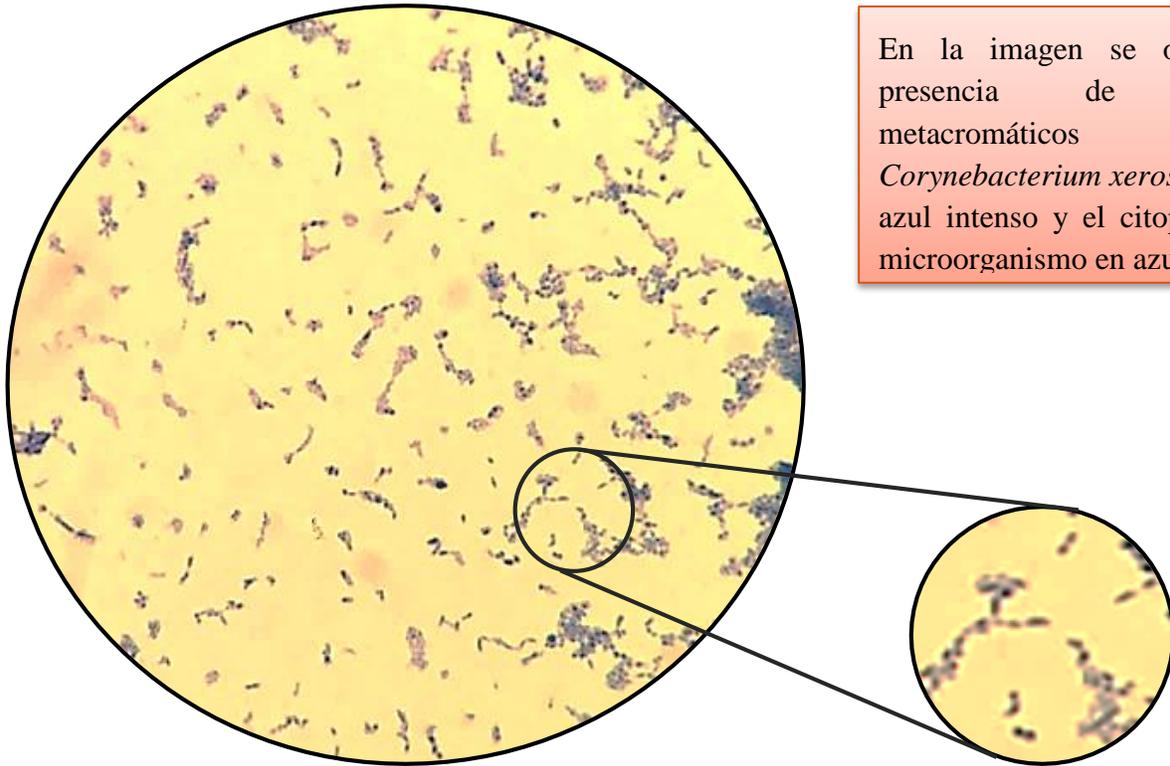
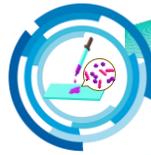
Figura 178. Interpretación de tinción de Loeffler **.

Nota 1: Para desechar el material biológico empleado durante el procedimiento deben seguirse las indicaciones marcadas en el apartado de “Fase post-analítica”, en la página 166.

Nota 2: Algunas limitaciones para la utilización de esta técnica de tinción pueden observarse en la página 196 (anexo 6.3.4).

* Fotografía tomada por los autores.

** Esquema realizado por los autores.



En la imagen se observa la presencia de gránulos metacromáticos de *Corynebacterium xerosis* en color azul intenso y el citoplasma del microorganismo en azul claro.

Figura 179. *Corynebacterium xerosis*, tinción de Loeffler, 100 X *.



3.2.1.3 Tinciones simples

Las tinciones simples utilizan un solo colorante, por lo que en este tipo de tinción toda la muestra se tiñe del mismo color y permiten conocer la morfología y tipo de agrupación bacteriana, como es el caso de la tinción de Loeffler, en donde se emplea azul de metileno como único colorante. Se basan en el hecho de que las células tienen una composición química diferente a la de su entorno, de modo que ambos se comportan de forma diferente frente a un colorante ^(33,36,48).

3.2.1.3.1 Tinción de azul de algodón lactofenol

Las tinciones de azul de algodón lactofenol son muy útiles para el área de la micología, ya que nos permite determinar las estructuras con mejor claridad al observarlas al microscopio ⁽²⁴⁾.

En este caso se emplearon hongos pertenecientes al grupo de los dermatofitos, los cuales tienen la capacidad de degradar la queratina de pelo, uñas y plumas, produciendo infecciones en mamíferos, incluyendo a los humanos, las cuales son llamadas dermatofitosis. Dentro de estos hongos se reconocen principalmente a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* ⁽²⁹⁾.

3.2.1.3.1.1 Fundamento de la tinción de azul de algodón lactofenol

Esta tinción se utiliza en el laboratorio de micología para la demostración de la mayoría de los hongos miceliales. El azul de lactofenol tiene tres funciones importantes al momento de observar hongos del tipo mohos obtenidos por aislamiento de medios inoculados. 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 ⁽⁴⁹⁾.

Es útil para realizar el examen directo de cultivos, ya que es una técnica rápida que permite visualizar perfectamente las estructuras fúngicas. El colorante es fuertemente ácido y se usa para la tinción directa de micelio micólico, el cual toma un delicado color azul claro ^(12,26,29).



1 Colorante: Azul de algodón lactofenol

Los componentes del colorante actúan de la siguiente forma:

-**Ácido láctico** preserva las estructuras fúngicas

-**Fenol** destruye la flora acompañante e inactiva la célula

-**Azul de algodón** tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas

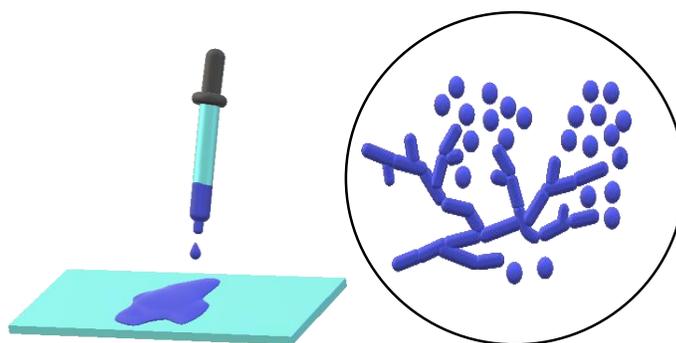


Figura 180. Esquema de la técnica de la tinción de azul de algodón lactofenol **.

La comparación realizada para esta técnica con diferentes autores es descrita a continuación. Así mismo con base en dicha comparación y a lo realizado en el laboratorio, la técnica empleada para esta tinción se describe posteriormente en el procedimiento.

Tinción de azul de algodón lactofenol			
Referencia	Arenas R	Prats G	UGR
Técnica de tinción	-Luego del crecimiento del hongo en el microcultivo, se retiran el cubreobjetos y el agar. De este modo, los filamentos y los órganos de reproducción quedan unidos al cubreobjetos y al portaobjetos. Ambas partes se montan con azul de algodón.	-Tras incubación de unos días, se toma el cubreobjetos que lleva adheridos los filamentos fúngicos y se pone sobre un portaobjetos en el que se ha depositado una gota de azul de algodón lactofenol previamente.	-Posterior a la incubación, cuando aparezca un crecimiento visible, puede separarse el cubreobjetos suavemente de la superficie del agar y colocarlo sobre una gota de lactofenol en un segundo portaobjetos.

Cuadro 21. Comparación de técnicas empleadas por diferentes autores para la tinción de azul de algodón ^(68, 73,74).

** Esquema realizado por los autores.



3.2.1.3.1.2 Hongos dermatofitos

De manera general, la importancia de los hongos así como de las bacterias radica en distinguir cuáles son de importancia clínica, dentro del grupo de los hongos destacan los dermatofitos, los cuales tienen la capacidad para degradar la queratina de pelo, uñas y plumas y pueden producir infecciones superficiales en mamíferos, incluidos los humanos (hospederos inmunocompetentes), llamadas dermatofitosis. Dentro de estos hongos se reconocen principalmente a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* ^(75, 76).

Los tres géneros ya mencionados constituyen un total aproximado de 40 especies, de las cuales aproximadamente 12 son patógenos para el humano. Los dermatofitos pueden encontrarse en la naturaleza en estado anamorfo y teleomorfo. Los estados anamorfos pertenecen al filum Deuteromycota y los estados teleomorfos pertenecientes al filum Ascomycota. Además, las especies de dermatofitos se pueden clasificar de acuerdo a su nicho ecológico en: geofílicos, siendo los dermatofitos que se localizan generalmente en el suelo y raramente ocasionan infecciones a humanos; los zoofílicos, que colonizan a animales y pueden transmitirse ocasionalmente a humanos y, por último, las especies antropofílicas, las cuales son transmitidas de humano a humano ⁽⁷⁶⁾.

Las infecciones por dermatofitos tienen prevalencia mundial y son conocidas clínicamente como “tiñas” o “tinea”. Generalmente, estas infecciones reciben su nombre con base en la zona del cuerpo donde se localizan, nombrándose primero la palabra tiña y después nombrándose en latín la zona anatómica involucrada, por ejemplo: tiña de la cabeza o tinea capitis ⁽⁷⁶⁾.

Los síntomas de estas infecciones generalmente están acompañados de escozor y, dependiendo de la zona en que se encuentre la sintomatología puede ser de mayor o menor grado. Algunas formas clínicas son las siguientes: tinea barbae, causando tiña de la barba y el bigote; tinea capitis, causando tiña de piel cabelluda, cejas y pestañas; tinea corporis, causando tiña en piel glabra; tinea cruris, afectando la ingle; tinea manuum, afectando las manos; tinea pedis, generando tiña en pies y, tinea unguium, que afecta las uñas. Es importante saber que varias partes del cuerpo pueden estar infectadas por el mismo dermatofito y los diferentes géneros pueden ocasionar lesiones clínicamente idénticas, por lo cual es necesario reconocer las características principales de cada género y especie ⁽⁷⁶⁾.



3.2.1.3.1.3 Procedimiento de la tinción de azul de algodón lactofenol

Material	Aparatos y equipo	Reactivos	Cepas
-Portaobjetos -Mechero Bunsen con manguera -Encendedor -Piseta -Gradilla -Pinzas -Cubreobjetos	-Microscopio -Cronómetro	-Azul de algodón lactofenol	- <i>Trichophyton rubrum</i> (ATCC 28188) - <i>Microsporum canis</i> (ATCC 11621) - <i>Microsporum nanum</i> (ATCC 28951) - <i>Trichophyton mentagrophytes</i> - <i>Microsporum gyseum</i>

Cuadro 22. Material, aparatos, equipos, reactivos y cepas empleadas para la tinción de azul de algodón lactofenol.



Figura 181. Material necesario para la tinción de azul de algodón lactofenol *.



Figura 182. Aparatos y equipo a emplear en la tinción de azul de algodón lactofenol *.

* Fotografía tomada por los autores.

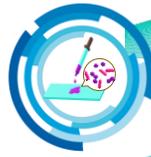


Figura 183. Reactivos a emplear en la tinción de azul de algodón lactofenol *.



Figura 184. Cepas a emplear en la tinción de azul de algodón lactofenol *.

* Fotografía tomada por los autores.



Tinción de Azul de algodón lactofenol ⁽⁶⁸⁾

Preparación de la muestra

1

Realizar microcultivo de cada una de las cepas a observar e incubar a temperatura ambiente, revisando periódicamente el desarrollo de estas (de 3 a 7 días) (figura 185).



Figura 185. Microcultivo de cepas *.

2

Inactivar el crecimiento del microcultivo retirando el glicerol (figura 186) y adicionando formol, con ayuda de una pipeta (figura 187).



Figura 186. Retirando el glicerol del microcultivo *.

* Fotografía tomada por los autores.

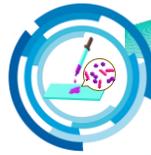


Figura 187. Adición del formol al microcultivo *.

3

Retirar el portaobjetos de arriba (figura 188) y el agar (figura 189), con la ayuda de pinzas.



Figura 188. Retirado de portaobjetos *.

* Fotografía tomada por los autores.

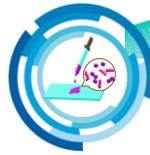


Figura 189. Retirado de agar *.

Realización de la tinción

4

Colocar una gota de colorante **azul de algodón lactofenol** en la muestra contenida el portaobjetos de abajo o de arriba (figura 190).

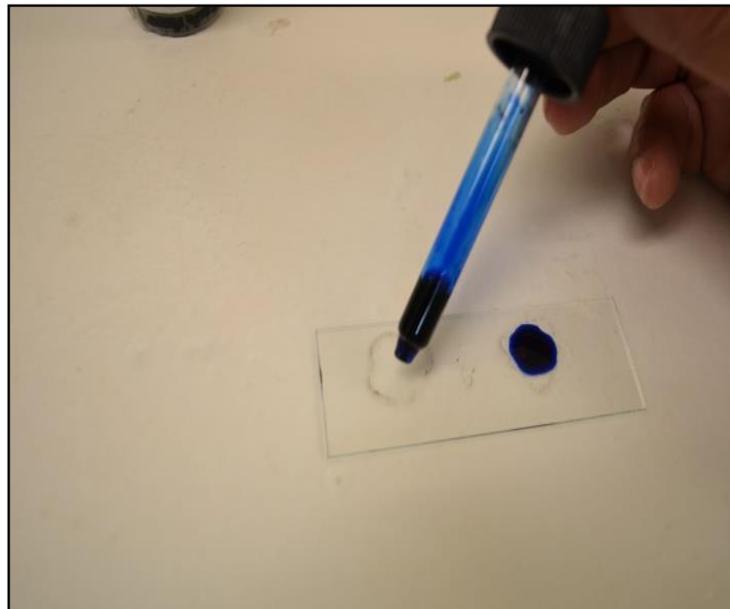
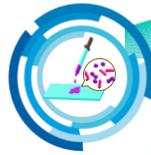


Figura 190. Aplicación de colorante azul de algodón lactofenol *.

* Fotografía tomada por los autores.



5

Cubrir la preparación con un cubreobjetos (figura 191).

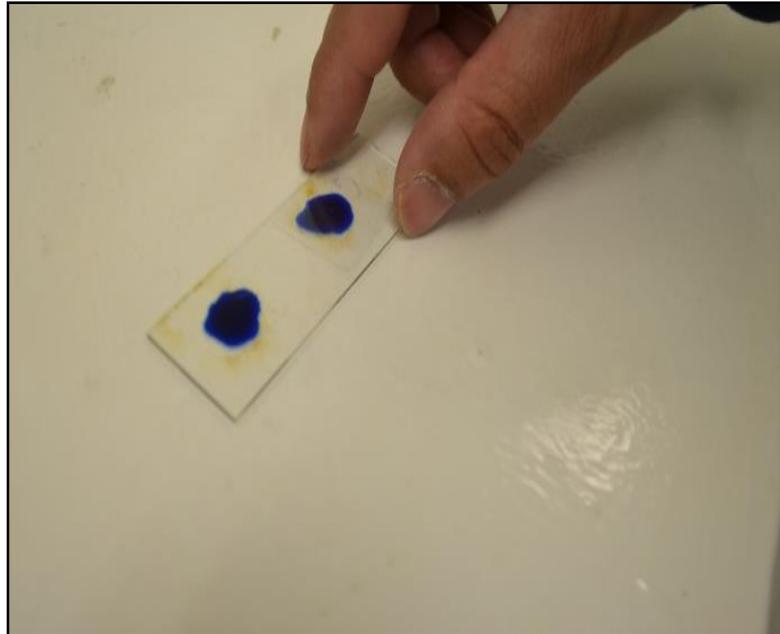


Figura 191. Colocación de cubreobjetos *.

6

Observar las estructuras fúngicas al microscopio a 40X (figura 192).

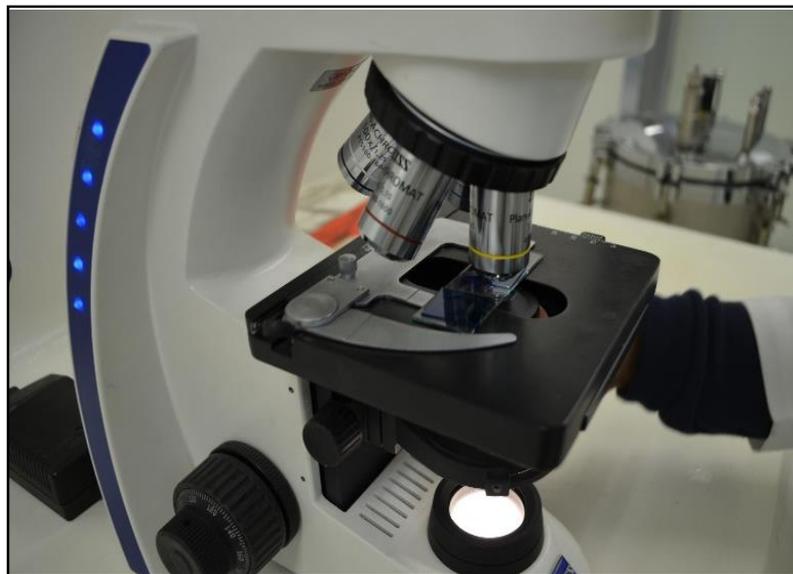
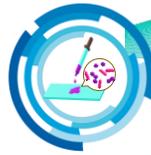


Figura 192. Observación al microscopio *.

Nota 1: Revisar que el micelio haga contacto con la superficie de los portaobjetos para asegurar que exista muestra en ellos.

* Fotografía tomada por los autores.



Nota 2: Para desechar el material biológico empleado durante el procedimiento deben seguirse las indicaciones marcadas en el apartado de “Fase post-analítica”, en la página 166.

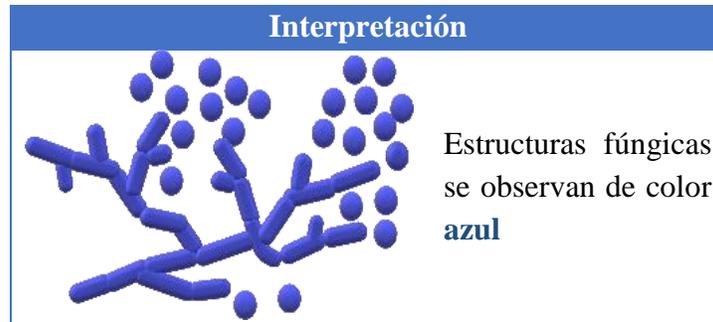


Figura 193. Interpretación de tinción de azul de algodón lactofenol **.

Nota 3: Se debe considerar que las estructuras fúngicas son variables y dependen del género y especie a la cual pertenezca el hongo.

Nota 4: Algunas limitaciones para la utilización de esta técnica de tinción pueden observarse en la página 197 (anexo 6.3.6).

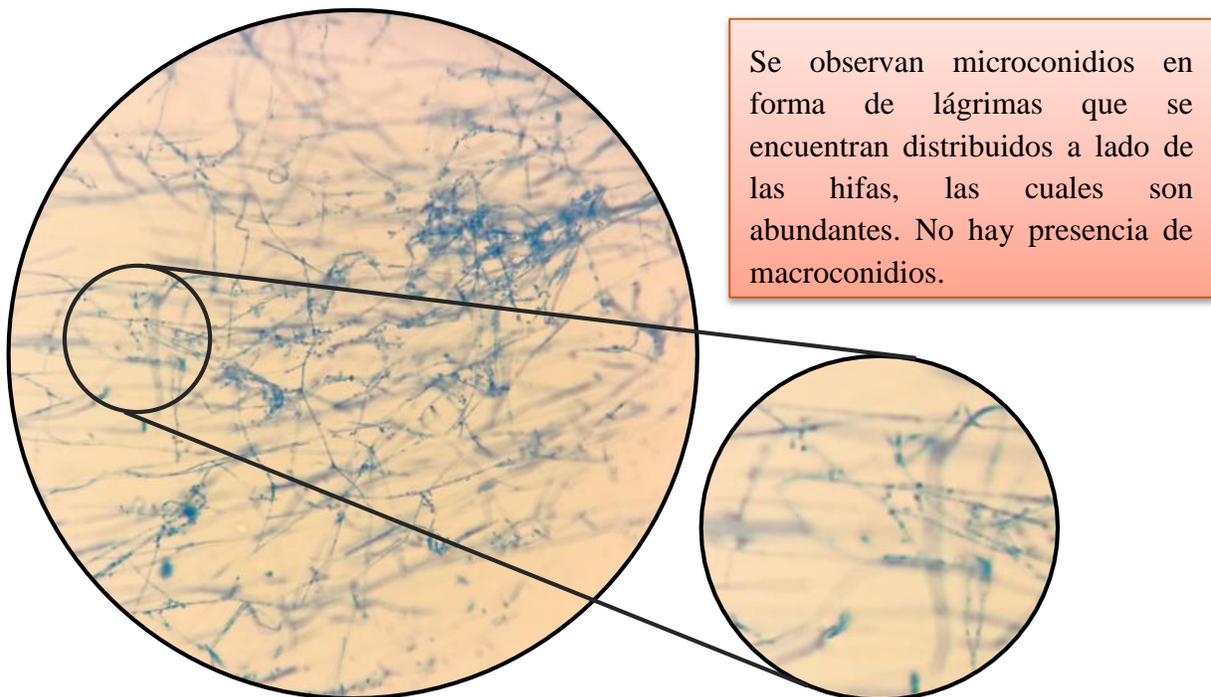
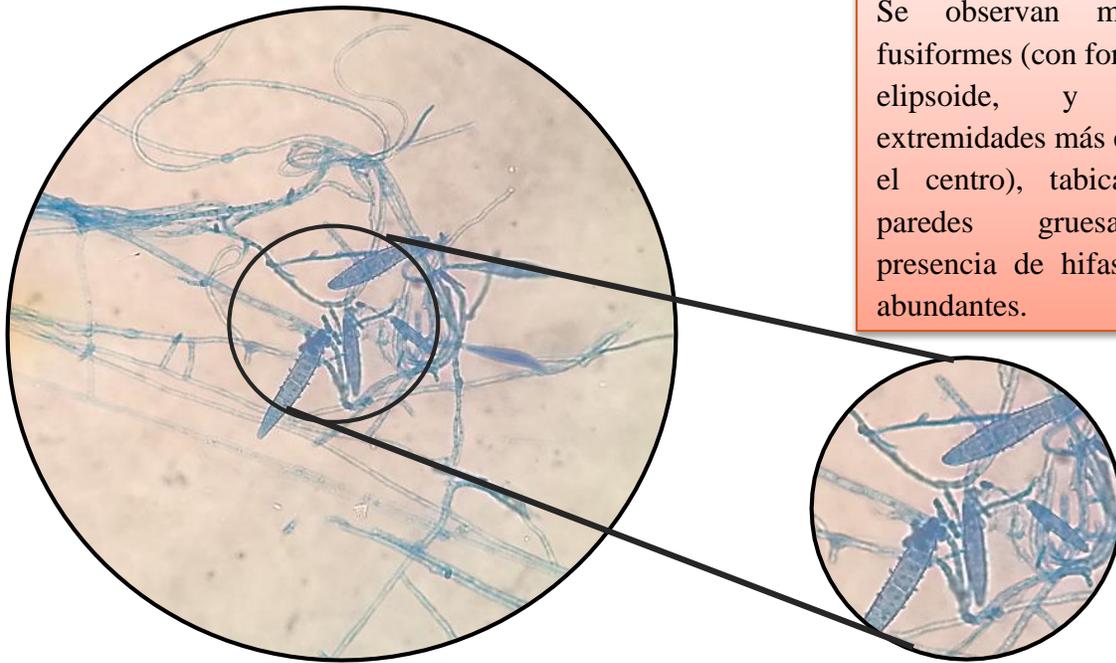
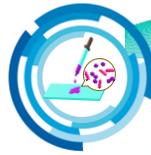


Figura 194. *Trichophyton rubrum*, tinción de azul de algodón lactofenol, 40X *.

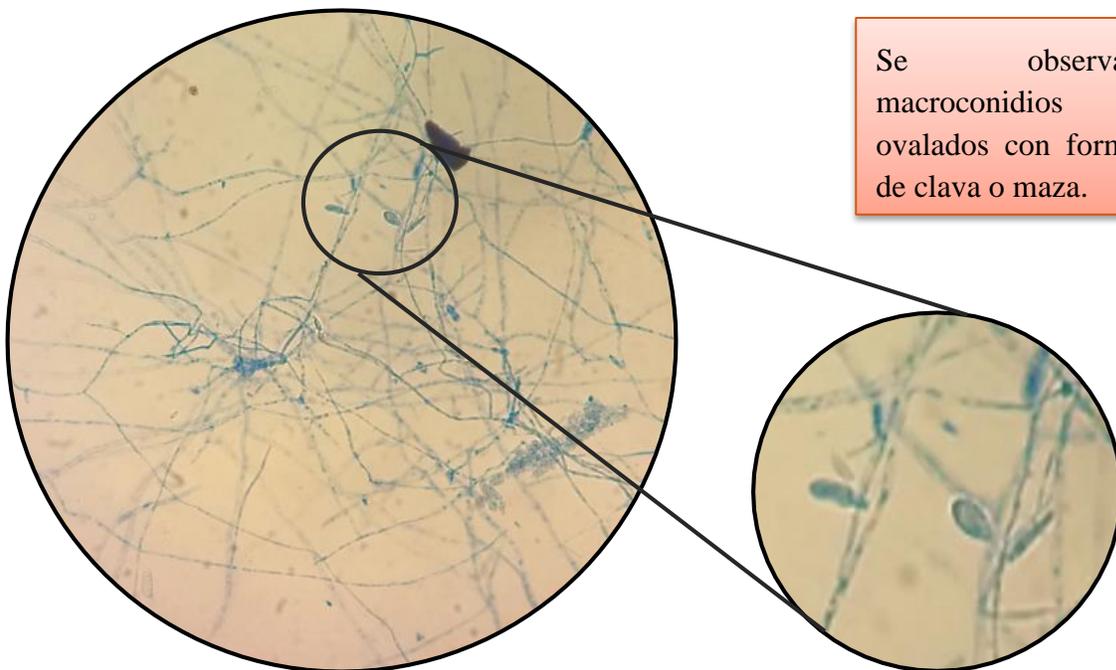
* Fotografía tomada por los autores.

**Esquema realizado por los autores.



Se observan macroconidios fusiformes (con forma alargada, elipsoide, y con las extremidades más estrechas que el centro), tabicados y con paredes gruesas. Existe presencia de hifas delgadas y abundantes.

Figura 195. *Microsporium canis*, tinción de azul de algodón lactofenol, 40X *.



Se observan macroconidios ovalados con forma de clava o maza.

Figura 196. *Microsporium nanum*, tinción de azul de algodón lactofenol, 40X *.

* Fotografía tomada por los autores.

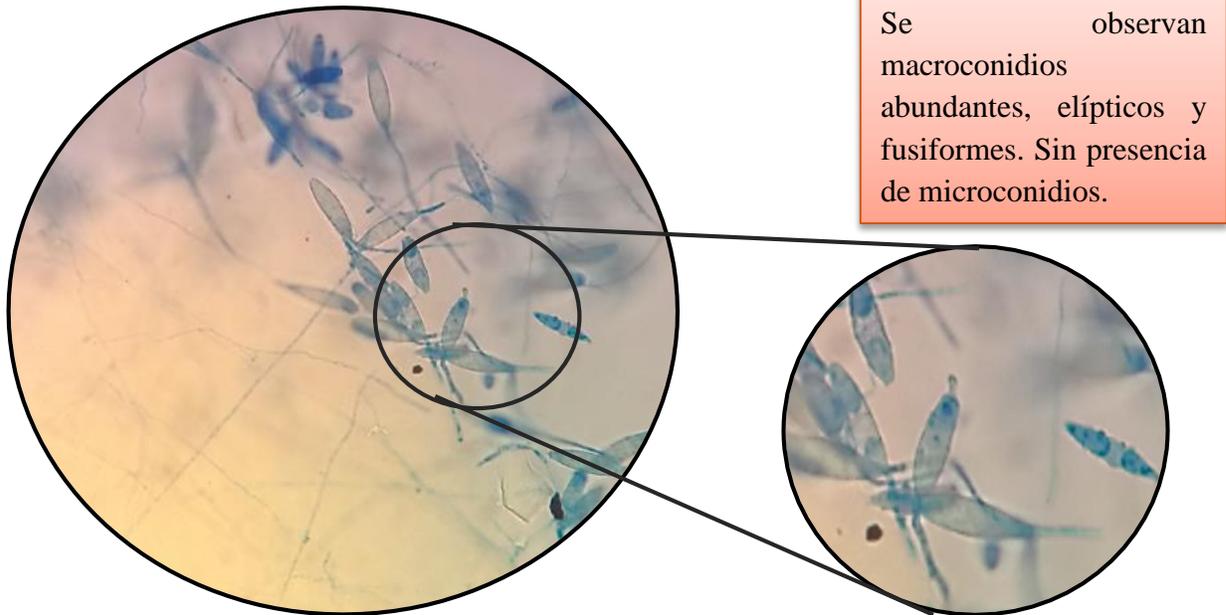
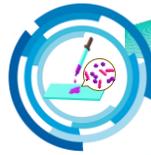


Figura 197. *Microsporium gypseum*, tinción de azul de algodón lactofenol, 40X *.

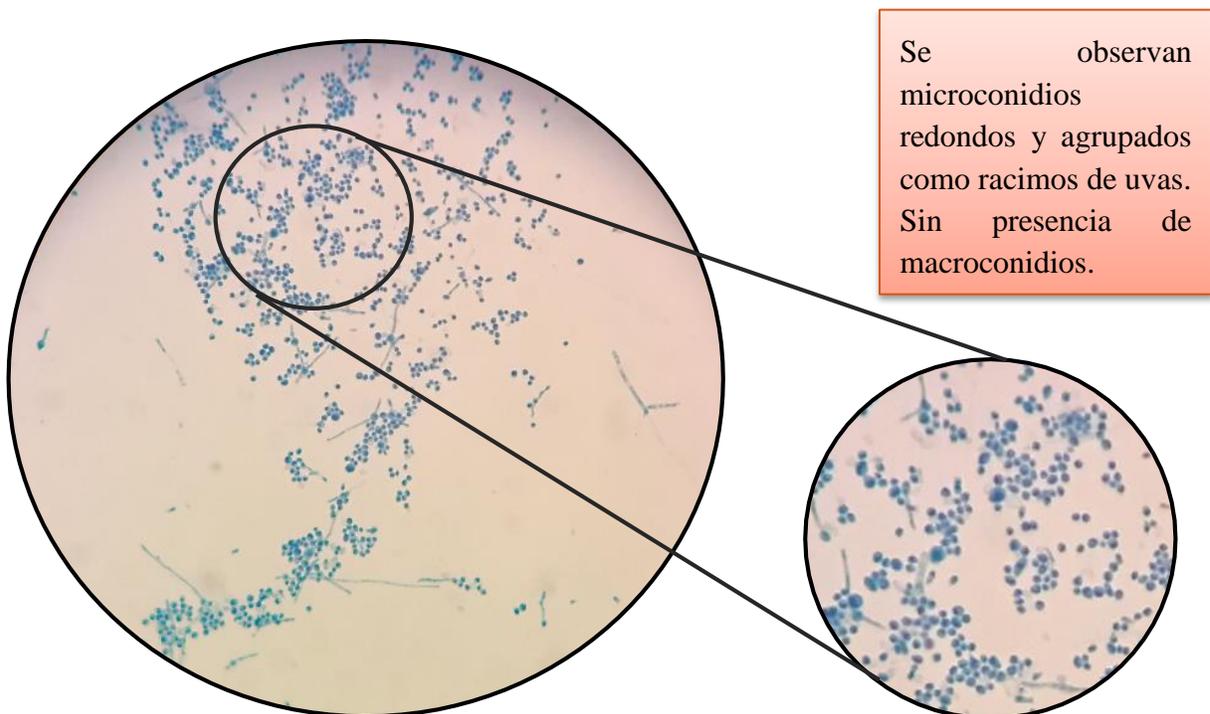


Figura 198. *Trichophyton mentagrophytes*, tinción de azul de algodón lactofenol, 40X *.

* Fotografía tomada por los autores.



3.3 Fase post-analítica

3.3.1 Introducción

Para la bioseguridad en el laboratorio es necesario contar con conocimientos básicos sobre desinfección y esterilización. Haciendo referencia a esto, los siguientes principios generales se aplican a todos los microorganismos patógenos conocidos. Los requisitos particulares de la descontaminación dependerán del tipo de trabajo experimental que se lleve a cabo y de la naturaleza de los agentes infecciosos que se estén manipulando. En la desinfección y esterilización se emplean diversos términos, algunos de los cuales se mencionarán a continuación ⁽⁷⁷⁾:

- Descontaminación: Se refiere a todo proceso empleado para eliminar o matar microorganismos. También se emplea para referirse a la eliminación o neutralización de sustancias químicas peligrosas y materiales radioactivos.
- Desinfección: Medio físico o químico para matar o eliminar microorganismos, pero no necesariamente esporas.
- Desinfectante: Se refiere a toda sustancia o mezcla de sustancias químicas empleada para matar o eliminar microorganismos, pero no necesariamente esporas. Los desinfectantes suelen aplicarse a superficies u objetos inanimados.
- Esterilización: Se refiere a todo proceso que mata o elimina todas las clases de microorganismos y esporas.

Algunos de los aspectos más importantes a considerar para el proceso de manejo del RPBI generado durante la realización de las tinciones del presente libro se mencionarán a continuación tomando en cuenta para ello lo establecido conforme a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

3.3.1.1. Clasificación y envasado de RPBI

La etapa de clasificación de desechos es la parte fundamental en el manejo de RPBI, para evitar riesgos a la salud y daños al medio ambiente, lo cual conlleva a una mejor administración de los recursos, disminuyendo así los gastos de operación ⁽⁷⁸⁾.

Dicho lo anterior es importante separar y envasar todos los residuos peligrosos biológico-infecciosos, de acuerdo con sus características físicas y biológicas infecciosas.



Figura 199. Clasificación y envasado de RPBI⁽⁷⁸⁾. Nota: En el apartado de “Bolsa transparente” es necesario aclarar que pueden emplearse bolsas de cualquier color, excepto rojas o amarillas.

En el caso de las extensiones y frotis para el examen microscópico, la fijación y tinción de muestras de sangre, esputo y heces para el microscopio no destruye necesariamente todos los organismos o virus de dichas extensiones, por lo que éstas deben manipularse con pinzas, almacenarse cuidadosamente y descontaminarse antes de ser eliminarlas, con excepción de aquellas que poseen esporas, las cuales deberán desecharse directamente en el contenedor de RPBI correspondiente sin previa descontaminación⁽⁷⁸⁾, tal como lo indica la Guía de cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

3.3.1.2. Tratamiento

Las instituciones de salud pueden realizar el tratamiento final de los residuos dentro de la misma unidad médica. En el caso de las instituciones educativas, éstas deben contratar los servicios de las instituciones autorizadas para realizar ésta función. A continuación, se describen de manera breve algunos de los métodos de tratamiento más comunes y los cuales fueron empleados en el manejo de RPBI generados para fines de este libro.

a. Esterilización

Para este proceso, la forma más limpia y económica es empleando autoclave, excepto para punzocortantes. El tratamiento en autoclave de vapor constituye el método de elección para todos los procesos de descontaminación. Sólo se recurrirá a otros métodos si éstos eliminan



o destruyen los microorganismos. En este caso las cajas de Petri desechables y otros dispositivos de plástico utilizados en el laboratorio quedan “irreconocibles”, es decir, para no volverse a utilizar. Una vez estériles e irreconocibles se podrán disponer como basura común (77,78).

b. Desinfección química

Consiste en la destrucción de agentes biológico infecciosos a excepción de las esporas de hongos y bacterias que suelen ser resistentes a este método, mediante la aplicación de sustancias químicas que actúan sobre la vida o desarrollo de los agentes biológico infecciosos (54).

3.3.1.3. Almacenamiento temporal y disposición final

Una vez que los RPBI hayan sido almacenados en los respectivos contenedores estos deberán ser tratados, por ejemplo, mediante un proceso de incineración, lo cual deberá ser realizado por las instituciones autorizadas. Una vez tratados podrán disponerse en los residuos sólidos urbanos y de manejo especial que cumplan con la normatividad vigente en materia, empleando para ello botes o bolsas de plástico de cualquier color excepto roja o amarillas.; los RPBI sin tratamiento deberán enviarse a empresas recolectoras autorizadas (77,78).

3.3.2 Procedimiento a realizar dentro del laboratorio

Al finalizar la tinción se generan residuos, es decir, Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI), que como ya se mencionó deben ser depositados en sus respectivos contenedores para ser desechados de manera correcta y cuidadosa tomando en cuenta la clasificación de contenedores de la Norma Oficial Mexicana 087, explicada al inicio de este libro, para lo cual se toman en consideración los siguientes pasos:

- Antes de proceder a desechar los residuos como lo indica la Norma Oficial Mexicana 087, se deben inactivar los portaobjetos empleados en la realización de las tinciones a excepción de aquellas preparaciones que contengan esporas de hongos o bacterias. Para esto se emplea un envase de vidrio limpio con tapa debidamente etiquetado (nombre de la sustancia que contiene, para qué se utilizará y la fecha), colocando en su interior una solución de hipoclorito de sodio al 5% (figura 200).

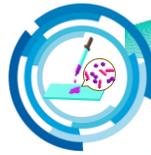


Figura 200. Inactivación de residuos *.

- Depositar los portaobjetos que contengan esporas de hongos o bacterias en un contenedor adecuado para RPBI, con base en la Norma Oficial Mexicana 087. En este caso corresponde depositarlos en un contenedor pequeño rojo de plástico rígido (figura 201). Es importante mencionar que los contenedores pequeños son de un único uso y únicamente deben ser cerrados hasta que estén llenos en su totalidad.



Figura 201. Depositando portaobjetos en contenedor rojo pequeño de plástico rígido *.

* Fotografía tomada por los autores.



-Especificaciones del contenedor: objetos cortantes y punzantes, se introducirán en recipientes de eliminación apropiados para su posterior incineración (proceso externo). Los recipientes de eliminación de dichos objetos serán resistentes a la perforación y no se llenarán por completo, únicamente hasta tres cuartas partes de su capacidad, es decir, en un 80%. Dichos recipientes deberán ser rígidos, de polipropileno color rojo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, que permitan verificar el volumen ocupado en el mismo, resistentes a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructibles por métodos físicos, tener separador de agujas y abertura para depósito, con tapa(s) de ensamble seguro y cierre permanente, deberán contar con la leyenda que indique “RESIDUOS PELIGROSOS PUNZOCORTANTES BIOLÓGICO-INFECCIOSOS” y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico ⁽⁴⁴⁾.

- Realizar una previa preparación del material de vidrio y plástico empleado durante los procedimientos de las tinciones. Posteriormente se esteriliza a 120° C y 15lb durante 15 minutos en autoclave (figura 202).



Figura 202. Esterilización de material empleado en los procedimientos de tinción *.

- Una vez realizada la esterilización de los materiales, éstos deben dejarse enfriar para lavar aquellos que lo requieran, por ejemplo, los tubos de ensayo de vidrio que contenían las cepas. Para el caso de los medios que contenían las cepas serán desechados en bolsas de plástico para colocar en la basura común (figura 203).

* Fotografía tomada por los autores.



Figura 203. Colocación de bolsa negra en basura común *.

Para comprender mejor el manejo de los Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos, a continuación se presenta un esquema en el que se muestran los pasos para el proceso del manejo de estos, desde la identificación de los residuos hasta su disposición final (figura 204).

Proceso de manejo de los RPBI

- Paso 1.**
Identificación de los residuos
- Paso 2.**
Envasado de los residuos generados
- Paso 3.**
Almacenamiento temporal
- Paso 4.**
Recolección y transporte externo
- Paso 5.**
Tratamiento
- Paso 6.**
Disposición final

Figura 204. Proceso de manejo de los RPBI ⁽⁷⁹⁾.

* Fotografía tomada por los autores.



4. Comparación del libro "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología: un enfoque gráfico", con textos similares

- Cuadro 23. Comparación del libro con textos similares

		Silverio CC. "Microbiología general para investigaciones de laboratorio" ⁽⁸⁰⁾	UAA. "Manual de prácticas de la materia de enfermedades bacterianas de los animales domésticos" ⁽⁸¹⁾	Orozco MG, Murray RM, et al. "Estrategia didáctica para la práctica de laboratorio de microbiología" ⁽⁸²⁾	Vázquez C, Silóniz MI.. "Técnicas básicas de microbiología. Observación de bacterias" ⁽⁸³⁾	Reynoso M, Magnoli C, Barros G, Demo M. "Manual de microbiología general" ⁽⁸⁴⁾
Medidas de bioseguridad		Aplica	Aplica	Aplica	No aplica	Aplica
Manejo de RPBI		No aplica	No aplica	Aplica	No aplica	Aplica
Indicaciones y precauciones	Descripción escrita	Aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Aplica ¹
	Fotografías correspondientes	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
Tinción -Parte teórica-	Fundamento	Aplica	No aplica	Aplica	Aplica	Aplica
	Esquemas de la técnica de tinción	Aplica ¹	Aplica ¹	Aplica ¹	Aplica ¹	Aplica ³
	Cuadros comparativos de tiempos y técnica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
Tinción	Sustento bibliográfico	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica



	Listado	Material	Aplica ²	Aplica ²	Aplica ¹	Aplica ²	No aplica
		Aparatos y equipo	No aplica	No aplica	Aplica ¹	No aplica	No aplica
		Reactivos	Aplica	Aplica ²	Aplica	Aplica ²	No aplica
		Cepas	Aplica	No aplica	Aplica	Aplica ²	No aplica
	Uso de cepas ATCC		No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
	Fotografías	Material	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
		Aparatos y equipo	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
		Reactivos	Aplica ¹	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
		Cepas	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
	Numeración de los pasos		Aplica	Aplica	Aplica ¹	No aplica	Aplica
	División por etapas		No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
	Fotografías del procedimiento		Aplica ¹	No aplica	No aplica	Aplica ¹	No aplica
	Tinción-Observación al microscopio-	Fotografías de las preparaciones		No aplica	Aplica ¹	Aplica	Aplica
Descripción y/o interpretación esquemática		Aplica ¹	Aplica ¹	Aplica	Aplica ¹	Aplica	
“Notas” aclaratorias		No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
RPBI generado-Manejo-	Descripción escrita		Aplica ⁴	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
	Fotografías correspondientes		No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
Uso de las etapas pre-analítica, analítica y post-analítica		No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
Bibliografía consultada		Aplica	Aplica	Aplica	Aplica	Aplica	

Continúa en la siguiente página



1. Aplica parcialmente: No está descrita o presente en todas las tinciones.
2. No hay una separación de los listados de material, reactivos, cepas y aparatos, según sea el caso.
3. Sólo muestra esquema de la etapa de preparación de la muestra.
4. Sin sustento normativo ni clasificación de residuos.
5. De forma no secuencial.
6. Sólo describe una breve introducción al tema.
7. De forma no secuencial.

		Rojas A. “Conceptos y práctica de microbiología general” (85)	Sanz SA “Prácticas de microbiología” (86)	López LE, Hernández M, et al. “Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología” (49)	Castañeda MT. “Microbiología aplicada. Manual de laboratorio” (87)	UNAM. Facultad de Química. “Protocolo de prácticas. Microbiología Experimental” (88)
	Medidas de bioseguridad	Aplica	No aplica	No aplica	Aplica	Aplica
	Manejo de RPBI	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
Indicaciones y precauciones	Descripción escrita	Aplica	Aplica	No aplica	Aplica	Aplica
	Fotografías correspondientes	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
Tinción -Parte teórica-	Fundamento	Aplica	Aplica ¹	Aplica	Aplica	Aplica
	Esquemas de la técnica de tinción	Aplica	Aplica	Aplica ¹	Aplica ³	No aplica
	Cuadros comparativos de tiempos y técnica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
Tinción	Sustento bibliográfico	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica



	Listado	Material	Aplica ²	No aplica	No aplica	Aplica ²	Aplica ²
		Aparatos y equipo	Aplica ²	No aplica	No aplica	Aplica ²	Aplica ²
		Reactivos	Aplica ²	Aplica	No aplica	Aplica ²	Aplica ²
		Cepas	No aplica	No aplica	No aplica	Aplica ²	Aplica ²
	Uso de cepas ATCC		No aplica				
	Fotografías	Material	No aplica				
		Aparatos y equipo	No aplica				
		Reactivos	No aplica				
		Cepas	No aplica				
	Numeración de los pasos		Aplica	Aplica	Aplica ¹	Aplica	Aplica
	División por etapas		Aplica	Aplica ⁵	No aplica	Aplica ⁵	Aplica
	Fotografías del procedimiento		No aplica				
	Tinción-Observación al microscopio-	Fotografías de las preparaciones		No aplica	No aplica	Aplica	No aplica
Descripción y/o interpretación esquemática			Aplica	Aplica	Aplica	Aplica	No aplica
“Notas” aclaratorias			Aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
RPBI generado -Manejo-	Descripción escrita		No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Aplica ⁴
	Fotografías correspondientes		No aplica				
Uso de las etapas pre-analítica, analítica y post-analítica		No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica



Bibliografía consultada	Aplica	Aplica	Aplica	Aplica	Aplica
-------------------------	--------	--------	--------	--------	--------

1. Aplica parcialmente: No está descrita o presente en todas las tinciones.
2. No hay una separación de los listados de material, reactivos, cepas y aparatos, según sea el caso.
3. Sólo muestra esquema de la etapa de preparación de la muestra.
4. Sin sustento normativo ni clasificación de residuos.
5. De forma no secuencial.
6. Sólo describe una breve introducción al tema.
7. De forma no secuencial.

		UNAM. FES Zaragoza. "Manual de Laboratorio Microbiología General I" ⁽⁸⁹⁾	Olivas E, Alarcón LR. "Manual de Prácticas de microbiología básica y microbiología de los alimentos" ⁽⁹⁰⁾	Montoya OI "Manual de microbiología" ⁽⁹¹⁾	SGM "Basic Practical Microbiology" ⁽⁴²⁾	García A, Zamudio MM. "Manual de microbiología médica". ⁽⁶⁹⁾
	Medidas de bioseguridad	Aplica	No aplica	No aplica	Aplica	No aplica
	Manejo de RPBI	Aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
Indicaciones y precauciones	Descripción escrita	Aplica	No aplica	Aplica	Aplica	No aplica
	Fotografías correspondientes	No aplica	No aplica	No aplica	Aplica ¹	No aplica
Tinción -Parte teórica-	Fundamento	No aplica ⁶	Aplica ¹	Aplica	No aplica	Aplica
	Esquemas de la técnica de tinción	Aplica	No aplica	Aplica	No aplica	No aplica

Continúa en la siguiente página



	Cuadros comparativos de tiempos y técnica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
Tinción- -Procedimiento-	Sustento bibliográfico	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
	Listado	Material	Aplica	No aplica	Aplica ²	No aplica	No aplica
		Aparatos y equipo	Aplica	No aplica	Aplica ²	No aplica	No aplica
		Reactivos	Aplica	No aplica	Aplica ²	Aplica	No aplica
		Cepas	Aplica	No aplica	Aplica ²	Aplica	No aplica
	Uso de cepas ATCC	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
	Fotografías	Material	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
		Aparatos y equipo	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
		Reactivos	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
		Cepas	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
	Numeración de los pasos	Aplica	Aplica	No aplica	Aplica	Aplica	
	División por etapas	Aplica ⁷	Aplica	Aplica ⁷	Aplica	No aplica	
	Fotografías del procedimiento	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
Tinción- Observación al microscopio-	Fotografías de las preparaciones	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
	Descripción y/o interpretación esquemática	No aplica	Aplica ¹	No aplica	Aplica ¹	Aplica	
	“Notas” aclaratorias	No aplica	No aplica	No aplica	Aplica	No aplica	
RPBI generado- Manejo-	Descripción escrita	Aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
	Fotografías correspondientes	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
Uso de las etapas pre-analítica, analítica y post-analítica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica		
Bibliografía consultada	Aplica	Aplica	Aplica	Aplica	Aplica		



1. Aplica parcialmente: No está descrita o presente en todas las tinciones.
2. No hay una separación de los listados de material, reactivos, cepas y aparatos, según sea el caso.
3. Sólo muestra esquema de la etapa de preparación de la muestra.
4. Sin sustento normativo ni clasificación de residuos.
5. De forma no secuencial.
6. Sólo describe una breve introducción al tema.
7. De forma no secuencial.

- **Análisis**

Los aspectos presentes en el cuadro 23 permiten realizar una comparación general del libro "Las tinciones básicas en el laboratorio de Microbiología: un enfoque gráfico" en contraste con diversos materiales semejantes, tales como libros, artículos, manuales, etc., disponibles en internet y otras fuentes de información. Los aspectos tomados en cuenta para realizar dicha comparación, incluyen diversas características tanto de la parte teórica como de la experimental, ya sea con partes descritas y/o que son complementadas con material gráfico (fotografías y esquemas) que, en conjunto tienen la finalidad de proporcionar una comprensión más sencilla de los temas a tratar y cubrir aquellos aspectos que pueden causar confusión o dudas.

Con respecto a lo anterior, es importante mencionar que en el libro "Las tinciones básicas en el laboratorio de Microbiología: un enfoque gráfico" presenta un contenido dirigido a cubrir aquellos aspectos necesarios para la comprensión de los temas abordados por el mismo, teniendo por ello una estructura basada en las etapas pre-analítica, analítica y post-analítica, lo que permite dar una secuencia lógica del procedimiento que se realiza, asegurando en este un aspecto muy importante como lo es el control de calidad en el laboratorio, proporcionando así resultados confiables.

Cabe destacar que los apartados "Medidas de bioseguridad", "Manejo de RPBI" y "Manejo de RPBI generado" fueron incluidos en el presente libro con el fin de ofrecer al lector un breve antecedente del tema que, así mismo se aborda con mayor detenimiento en la parte final del libro con imágenes de autoría propia (fotografías). Como se puede observar, la mayor parte de los materiales que se comparan en el cuadro 23 no contienen estos apartados o, únicamente contienen a alguno de estos. La importancia de los temas que se abordan en estos apartados reside en que éstos son aplicados de manera general en todos los procedimientos realizados en el laboratorio y no únicamente para la realización de las técnicas de tinción. Así mismo, se debe tener en cuenta que la omisión de estos temas limitaría al personal del laboratorio en el conocimiento de la normatividad vigente y, por lo tanto, esto afectaría de manera negativa en las actividades que se llevan a cabo diariamente en el laboratorio, por lo que se debe tomar en cuenta el manejo de RPBI una vez que se hayan generado residuos a consecuencia de los procedimientos realizados.



Por otra parte, el apartado de “Indicaciones y precauciones” contiene una breve descripción escrita y sus respectivas fotografías, ambos aspectos en conjunto dan a conocer puntos necesarios a considerar antes de realizar alguna técnica de tinción. También está contenida una parte teórica de las tinciones con sus respectivos esquemas gráficos que la complementan, así como cuadros comparativos de los tiempos y técnicas de tinción empleados por diversos autores para la realización de cada tinción. En este sentido, es importante resaltar que los cuadros comparativos son de gran utilidad para el usuario del libro, debido a que sirven de punto de referencia para las tinciones que fueron seleccionadas (por ensayo y error, las condiciones del laboratorio, los materiales y reactivos disponibles en el laboratorio de Bacteriología y micología médicas de la FESZ UNAM, etc.) para realizarse en el laboratorio, además de que aportan el sustento bibliográfico necesario para saber de dónde se obtuvo la información, ya que muchas ocasiones (como sucedió en la mayoría de los documentos comparados) no especifica tal cual la procedencia de la información que están dando a conocer. Cabe mencionar que, cuadros similares a estos no se encontraron incluidos en ninguno de los materiales revisados. La utilidad de estos reside en que su uso es apropiado en dado caso que demás personal afín al área de las ciencias Químico Biológicas diferentes a los alumnos y profesores de ésta institución, quieran hacer uso de éste libro, pudiendo probar con alguna de las otras técnicas que este material ofrece, pues es claro que no todos los laboratorios cuentan con los mismos materiales y reactivos.

En cuanto al apartado que comprende la realización de la tinción, éste se presenta de forma ordenada y secuencial, con fotografías de autoría propia con las cuales se pretende que haya un mejor entendimiento del texto, considerando también para ello el ordenamiento adecuado de los elementos empleados en la tinción (es decir, el material, aparatos y equipo, reactivos, cepas) agrupados en listas según sea el caso, para brindar una estructura más comprensible y de fácil uso. Además, se toman en cuenta las fases que comprende la realización de una técnica de tinción, presentándose todos los pasos de forma numerada y con sus respectivas fotografías. Por último, se muestra la imagen del microorganismo a observar al microscopio (fotografía y esquema) con su respectiva descripción y/o interpretación para proporcionar una idea de lo que se debe obtener como resultado final de la técnica de tinción. Con respecto a lo anterior, se encontró que en muchos de los materiales consultados, existía un orden del procedimiento y la numeración del mismo, pero no había un formato que fuera constante para todas las tinciones, también en algunos de los casos, los elementos a emplear en la técnica de tinción estaban incompletos o no estaban ordenados y, en muchos de los casos no se incluían esquemas ni fotografías de las tinciones, ya sea en la parte de realización de la tinción o en la de observación al microscopio.



Finalmente, y, a manera de resumen, es importante mencionar que el presente libro contiene características que lo hacen inédito, debido a que éstas no están presentes en muchos de los materiales consultados y comparados, pues algunos únicamente contienen ciertos de los aspectos ya mencionados, pero carecen de otros, o en su defecto, no poseen una misma estructura ordenada para todas las tinciones planteadas. Algunas de las características más notables son las siguientes:

- Aspecto teórico y descripciones de la parte experimental, con un sustento bibliográfico.
- Cuadros comparativos de los tiempos y técnicas de tinción empleados por diversos autores.
- Imágenes (fotografías y esquemas) de autoría propia, tanto de los pasos de los procedimientos como de las observaciones al microscopio, otorgándole un enfoque gráfico tanto a la parte teórica como a la experimental.
- Uso de las etapas pre-analítica, analítica y post-analítica.
- Manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) de acuerdo a la normatividad vigente.

Es necesario mencionar que la mayoría de los materiales consultados no contienen los puntos anteriormente enlistados, debido a que generalmente se centran en describir la parte práctica únicamente, sin presentación de imágenes, esquemas, etc., es decir, se enfocan mayormente en la realización de la técnica de tinción y no abordan otros aspectos que son importantes para la comprensión del lector, así como para la obtención de un resultado confiable de la técnica. Para conocer de manera detallada cuáles documentos contienen tales características y cuáles no, se puede observar el cuadro ya mencionado anteriormente (cuadro 23).



5. Referencias

1. Microbiology Society. Introducing microbes [Internet]. UK: Microbiology society; 2018 [citado el 16 de diciembre del 2018]. Disponible en: <https://microbiologyonline.org/about-microbiology/introducing-microbes>
2. Britannica. The importance of bacteria to humans [Internet]. Reino Unido: Encycloaedia Britannica; 2018 [citado el 17 de diciembre del 2018]. Disponible en: <https://www.britannica.com/science/bacteria/The-importance-of-bacteria-to-humans>
3. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. Nature [Internet]. 2007 Oct [citado el 15 de diciembre de 2019]; 449(18): 811-818. Disponible en: http://fire.biol.wvu.edu/cmoyer/zztemp_fire/biol405_F09/papers/Dethlefsen_human%20microflora%20review_nat07.pdf
4. Kumar A, Chordia N. Role of microbes in human health. Appl Microbiol [Internet]. 2016 Abril [citado el 18 de diciembre del 2018]; 3(2): 2-4. Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/role-of-microbes-in-human-health-2471-9315-1000131.php?aid=88460>
5. Pelczar MJ, Pelczar RM. Microbiology [Internet]. Reino Unido: Encycloaedia Britannica; 2018 [citado el 15 de diciembre del 2018]. Disponible en: <https://www.britannica.com/science/microbiology>
6. Samiksha S. Microorganisms: definition, types and importance [Internet]. s/f [citado el 16 de diciembre del 2018]. Disponible en: <http://www.yourarticlelibrary.com/micro-biology/microorganisms-definition-types-and-importance-with-figure-biology/26396>
7. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock, Biología de los microorganismos. 10^a ed. Buenos Aires: Pearson Educacion; 2004.
8. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 5^a ed. Barcelona: Elsevier; 2005.
9. Cobos JA. La historia del microscopio (Segunda parte). Ciencia y hombre, Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana [Internet]. 2012 [citado el 4 de enero de 2019]; 25 (2). Disponible en : <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num2/articulos/microscopio/>
10. Montoya VH. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2^a ed. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia; 2008.
11. Pelczar MJ, Chan EC. Elementos de microbiología. México: McGraw-Hill; 1984.
12. American Society for Microbiology, Murray PR, Baron EJ. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington, DC: Editorial ASM Press; 2003.



13. Nikon. Contraste [Internet]. 2019 [citado el 23 de julio de 2019]. Disponible en: http://www.tecnicaenlaboratorios.com/Nikon/Info_contraste.htm
14. Gamazo C, López I, Díaz R. Manual práctico de microbiología. 3ª ed. Barcelona: Editorial Masson; 2005.
15. Stainer RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR. Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2005.
16. Vives JL. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 3ª ed. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica; 2006.
17. Gama MA. Biología 1 biogénesis y microorganismos. 2ª ed. México: Editorial Pearson Prentice Hall; 2004.
18. UBA. Normas para el uso correcto del microscopio [Internet]. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2012 [citado el 28 de diciembre del 2018]. Disponible en: http://materias.df.uba.ar/f2bygAa2013c1/files/2012/07/gu%C3%ADa7_labo_microscop%C3%ADa_avanzada.pdf
19. BVS. Manual de parasitología, técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas [Internet]. Honduras: Biblioteca Médica Nacional; 2013 [citado el 3 de enero del 2019]. Disponible en http://www.bvs.hn/Honduras/Parasitologia/ManualParasitologia/flash/files/res/downloads/page_0037.pdf
20. Nuffield Foundation. Ciencia combinada guía del profesor 3. Madrid: Editorial Reverté; 1974.
21. Castro AM. Bacteriología médica basada en problemas. 2ª ed. México: Manual Moderno; 2014.
22. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, et al. Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas a color. 6ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006.
23. Uribe SA. Reino monera [Internet]. Medellín; s/f [citado el 29 de junio del 2019]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/biocienciasdesamuel/-reino-monera>
24. Barreto G, Rodríguez H. La cápsula bacteriana, algo más que una estructura no esencial. Rev. de producción animal [Internet]. 2007 [citado el 1 de abril del 2019]; 20(1): 69-80. Disponible en: <https://go.galegroup.com/ps/anonymous?id=GALE%7CA466298107&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=02586010&p=AONE&sw=w>
25. Granados R, Villaverde C. Microbiología: Tomo I. Madrid: Parainfo; 2003.
26. Bonifaz A. Micología médica básica. 5ª ed. México: McGraw Hill; 2015.
27. Biblio3. Hongos [Internet]. 2011 [citado el 17 de mayo del 2019]. Disponible en: <http://biblio3.url.edu.gt/Libros/2011/bot/19.pdf>



28. Red Interamericana de Laboratorios de Salud Animal. Manual ilustrado de técnicas de laboratorio utilizadas en bacteriología y micología veterinarias. México: RILSA; 1988.
29. Mier T, Toriello C, Ulloa M. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio. México: Universidad Autónoma Metropolitana; 2002.
30. Delgado A, Prieto S, Amich S, Salvo ML. Laboratorio de microbiología. Nueva York: McGraw-Hill Interamericana; 1994.
31. Canese A, Canese A. Manual de microbiología y parasitología médica. 7ª ed. Asunción: Arquimedes Canese; 2012.
32. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2009.
33. Lamanna C, Mallette MF, Zimmerman LN. Basic Bacteriology. 4th ed. Baltimore: The Williams and Wilkins Company; 1981.
34. Granados R, Villaverde MC. Ciencias de la salud: Microbiología. Madrid: Paraninfo; 1997.
35. Leboffe MJ, Pierce BE. Microbiology: Laboratory Theory and application, essentials. 3th ed. United States of America: Morton publishing; 2008.
36. Corcuera MT, Alonso MJ, Roldán M. Modificación de la técnica de Ziehl-Neelsen para la detección de micobacterias con la utilización de microondas [Internet]. 1996 [citado el 31 de agosto del 2018]; 29(1): 33-35. Disponible en: <http://www.conganat.org/seap/revista/v29-n1/6.pdf>
37. Montalvo CE. Técnica histológica [Internet]. 2010 [citado el 25 de julio de 2019]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf
38. Curiosoando.com. "¿Qué es una bacteria Gram positiva?" [Internet]. 2018 [consultado 21 mayo 2019]. Disponible en: <https://curiosoando.com/que-es-una-bacteria-gram-positiva>
39. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiología. 5ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2004.
40. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la microbiología. 9ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.
41. Vasanthakumari R. Practical microbiology. New Delhi: BI Publications Pvt Ltd; 2009.
42. Society for General Microbiology (SGM). Basic Practical Microbiology. UK: SGM; 2006.
43. INR. Manual básico de bioseguridad en laboratorios del INR [Internet]. México: Instituto Nacional de Rehabilitación (INR); 2009 [citado el 3 de marzo del 2019]. Disponible en: <http://www.inr.gob.mx/Descargas/MOP-SIB-04.pdf>



44. Saludgobmx. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo [Internet]. México: Secretaría de Gobernación (SEGOB); 2003 febrero [citado el 3 de marzo del 2019]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>
45. Cobalam. Servicios [Internet]. México: s/f [citado el 26 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.cobalam.com/servicios>
46. Manacorda AM, Cuadros DP, Álvarez AS. Manual Práctico de Microbiología y Parasitología [Internet] 2007 [citado el 23 de julio de 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/15024971/Cap-5-Coloraciones>
47. Morales GI, Castro G, Mendoza YC, Rubiano LA, Pacheco JM. Una mirada rápida al control de calidad interno en el quehacer diario del laboratorio de microbiología. Revista Medicina y Laboratorio. [Internet] 2017 [citado e 23 de julio de 2019]; 23 (9-10): 459-474. Disponible en: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/05/883832/control-de-calidad-lab-microbiologia.pdf>
48. Forbes BA, Sahm D, Weissfeld A. Bailey & Scott: Diagnóstico microbiológico. 12^a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
49. López LE, Hernández M, Colín CA, Ortega S, Cerón G, Franco R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en discapacidad [Internet]. 2014 enero [citado el 14 de mayo del 2019]; 3(1): 10-18. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>
50. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Procop GW, et al. Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas color. 5^a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2003.
51. Harvey RA, Champe PC. Microbiología. 2^a ed. Baltimore: Wolters kluwer; 2007.
52. Brock T, Brock K, Ward D. Basic Microbiology with applications. 3rd ed. E.U.A: Prentice-Hall; 1986.
53. Olivas E. Manual de prácticas de microbiología: programa de entrenamiento deportivo. Ciudad Juárez: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez; 2001.
54. Rodríguez E, Gamboa M, Hernández F, García J. Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 2005.
55. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica. 25^a ed. México: Mc Graw Hill; 2011.
56. Ramos J. Infectología clínica. 2^a ed. México: Manual Moderno; 2012.
57. Uribarren T. Tuberculosis [Internet]. México: UNAM, depto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina; 2011 [citado el 24 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/tuberculosis.html>



58. Goldman E, Green LH. Practical Handbook of Microbiology. 2nd ed. New York: CRC Press; 2009.
59. Witkowski L, Rzewuska M, Takai S, Kizerwetter-Świda M, Kita J. Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* in slaughtered swine, cattle and horses in Poland. BMC Microbiology [Internet]. 2016 May [citado el 2 de abril del 2019]; 16(1): 98-104. Disponible en: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-016-0712-9>
60. Rofe AP, Davis LJ, Whittingham JL, Latimer-Bowman EC, Wilkinson AJ, Pryor PR. The *Rhodococcus equi* virulence protein VapA disrupts endolysosome function and stimulates lysosome biogenesis. MicrobiologyOpen [Internet]. 2016 Oct [citado el 2 de abril del 2019]; 6(2): 1-17. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mbo3.416>
61. Cordeiro AB, Daza CA, Alves AC, Yumi C, Batista GH, Heinemann MB, et al. Identification of *Mycobacterium* species and *Rhodococcus equi* in peccary lymph nodes. Tropical animal health and production [Internet]. 2018 Mar [citado el 2 de abril del 2019]; 50(6): 1319-1326. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-018-1562-2>
62. Giles C, Vanniasinkam T, Ndi S, Barton MD. *Rhodococcus equi* (*Prescottella equi*) vaccines; the future of vaccine development. Equine veterinary journal [Internet]. 2015 Sept [citado el 2 de abril del 2019]; 47(5): 510-518. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24945608>
63. De Naranjo PJ, Rodríguez G, Rodríguez J, Caldas ML. La coloración de Ziehl-Neelsen en histopatología. Biomédica [Internet]. 1988 [citado el 1 de abril del 2019]; 8(3-4): 84-93. Disponible en: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1964>
64. García I. *Rhodococcus equi*: aspectos microbiológicos y clínicos [Internet] [citado el 28 de julio de 2019]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Requi.pdf>
65. Breakwell DP, Moyes RB, Reynolds J. Differential staining of bacteria: capsule stain. Current protocols in microbiology [Internet]. 2009 Nov [citado el 2 de abril del 2019]; 15 (1): A.3I.1-A.3I.4. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03is15>
66. Castañón LR. Criptococosis [Internet]. México: UNAM, depto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina; 2015 [citado el 02 de abril del 2019]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/criptococosis.html>
67. Barcia V, Sánchez SE. Utilidad de la prueba de tinta china como tamizaje para meningitis por *Cryptococcus spp.* Revista Ciencia UNEMI [Internet]. 2016 septiembre



- [citado el 2 de abril del 2019]; 9(20): 63-67. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5774761>
68. Arenas R. Micología médica ilustrada. 5ª ed. México: McGraw-Hill; 2014.
 69. García A, Zamudio MM. Manual de microbiología médica. 2ª ed. México: PAPIME-UNAM; 2010.
 70. Troya S. Tinción de la cápsula bacteriana. [Internet]. Panamá. 2013 [citado el 30 de enero del 2019]. Disponible en: <http://microbiologiaulat2013.blogspot.com/2013/12/tincion-de-la-capsulabacteriana.html>
 71. Ryan KJ, Ray G. Microbiología médica de Sherris. 5ª ed. México: McGraw-Hill; 2011.
 72. Kumar S. Essentials of Microbiology. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2016.
 73. Prats G. Microbiología clínica. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005.
 74. UGR. Observación de hongos de interés industrial [Internet]. Granada: Universidad de Granada. s/f [citado el 31 de enero del 2019]. Disponible en: <https://www.ugr.es/~cjl/hongos.pdf>.
 75. Pérez A. Identificación fenotípica y genotípica de aislados clínicos de dermatofitos procedentes de Guatemala [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014. 66 p.
 76. Díaz H. Caracterización morfológica y molecular de dermatofitos procedentes de México y Costa Rica [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014. 49 p.
 77. Organización Mundial de la Salud (OMS). Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 3ª ed. Ginebra: Organización Mundial de la Salud (OMS); 2005.
 78. Castañeda LE, Jiménez J, Urzúa A, Manzano RE, Valentín JJ, Pérez ES, et al. Guía de cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. 2ª ed. México: SSA, SEMARNAT; 2007.
 79. Secretaría de Salud. Guía para el manejo de los residuos peligrosos biológico infecciosos en unidades de salud. México: Secretaría de Salud; 2003.
 80. Silverio CC. Microbiología general para investigaciones de laboratorio. Ecuador: UTMACH; 2015.
 81. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Agropecuarias Medicina Veterinaria y Zootecnia. Manual de prácticas de la materia enfermedades bacterianas de los animales domésticos. Aguascalientes: UAA; 2007.
 82. Orozco MG, Murray RM, Murray VA, Murray AA. Estrategia didáctica para la práctica de laboratorio de microbiología. Nayarit: UTP editorial; 2017.
 83. Vázquez C, Martín A, Silóniz MI, Serrano S. Técnicas básicas de microbiología: Observación de bacterias. Reduca [Internet]. 2011 [citado el 13 de mayo del 2019];



- 3(5): 15-38. Disponible en: <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/819>
84. Reynoso M, Magnoli C, Barros G, Demo M. Manual de microbiología general. Río Cuarto: UniRío; 2015.
85. Rojas A. Conceptos y práctica de microbiología general. Palmira: Universidad Nacional de Colombia; 2011.
86. Sanz SA. Prácticas de microbiología. 2ª ed. La Rioja: Universidad de la Rioja; 2011.
87. Castañeda MT. Microbiología aplicada: manual de laboratorio. México: UAM; 2009.
88. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Protocolo de prácticas: microbiología experimental. México: UNAM; 2014.
89. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Manual de Laboratorio Microbiología General I. México: UNAM; 2017.
90. Olivas E, Alarcón LR. Manual de Prácticas de microbiología básica y microbiología de los alimentos. Ciudad Juárez: UACJ; 2004.
91. Montoya OI. Manual de microbiología. Medellín: Universidad Nacional de Colombia; 1999.
92. Romero R. Microbiología y parasitología humana. 3ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2007.
93. Nath SK, Revankar SG. Microbiología basada en la resolución de problemas. Madrid: Elsevier; 2007.
94. Evans AS, Brachman PS. Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control. 3th ed. New York: Plenum Publishing Corporation; 1998.
95. Labbé RG, García S, editors. Guide to Foodborne Pathogens. New York: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
96. Gillespie SH, Hawkey PM, editors. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2nd ed. UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2006.
97. Universidad de la República, Facultad de Medicina. Temas de bacteriología y virología médica [Internet]. Santiago: Universidad de la República; 2006 [citado el 12 de febrero del 2019]. Disponible en : <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/grampositivosaerobios.pdf>
98. Lamprea A, García A, Morales A. Síndrome de enterotiflocolitis aguda por *Klebsiella sp.* en un caballo pura raza española reporte de un caso. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias [Internet]. 2016 mayo [citado el 3 de abril del 2019]; 10(1): 102-111. Disponible en: https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2016.v10.n1.52616
99. Lanubeartista. Tintas [Internet]. s/f [consultado 16 May 2019]. Disponible en: http://www.lanubeartistica.es/dibujo_artistico_2/Unidad4/DA2_U4_T2_Contenidos_v01/24_tintas.html
100. Cromakit. Verde de malaquita [Internet]. Amposta; 2016 [citado el 16 de mayo del 2019]. Disponible en: <http://www.cromakit.es/pdfs/inserts/998989.pdf>



101. Becton, Dickinson and Company (BD). Gram stain kits and reagents [Internet]. U.S.A.; 2017 [citado el 30 de julio del 2019]. Disponible en: <http://legacy.bd.com/resource.aspx?IDX=19184>
102. González CM. Artritis infecciosa. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
103. IHR Diagnóstica. Coloración de BK [Internet]. Colombia; 2017 [citado el 30 de julio del 2019]. Disponible en: <http://ihrdiagnostica.com/wp-content/uploads/2018/01/Coloracion-BK-v4.pdf>
104. IHR Diagnóstica. Coloración de Albert [Internet]. Colombia; 2017 [citado el 30 de julio del 2019]. Disponible en: <http://ihrdiagnostica.com/wp-content/uploads/2018/01/Coloracion-ALBERT-v3.pdf>
105. Becton, Dickinson and Company (BD). Methylene blue Loeffler stain droppers [Internet]. U.S.A.; 2010 [citado el 30 de julio del 2019]. Disponible en: [http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L001217\(201006\).pdf](http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L001217(201006).pdf)
106. Becton, Dickinson and Company (BD). Indian ink reagents droppers [Internet]. U.S.A.; 2010 [citado el 30 de julio del 2019]. Disponible en: [http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L001203\(201006\).pdf](http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L001203(201006).pdf)
107. Cromakit. Azul de lactofenol [Internet]. España: Química Clínica Aplicada; 2015 [citado el 30 de julio del 2019]. Disponible en: <http://www.cromakit.es/pdfs/inserts/994970.pdf>



6. Anexos

6.1 Características de microorganismos empleados

A continuación, se muestra un cuadro en el que se recopila información acerca de las características básicas de los microorganismos empleados en este libro para la realización de las técnicas de tinción:

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>Corynebacterium xerosis</i>
Forma	Coco	Coco	Bacilo delgado, rectilíneo, incurvado y con extremos redondeados	Bacilo
Agrupación	Racimo de uvas	Cadenas o pares	Aislado	empaladiza o "letras chinas"
Tamaño	0.8-1.5 μm de diámetro	1-1.5 μm de diámetro	1-10 μm de largo por 0.2-0.6 μm de diámetro	1-6 μm
Movilidad	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Flagelos	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausente
Esporas	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausente
Cápsula	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausente
Gránulos metacromáticos	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Presentes
Otras	Gram positivo, anaerobio facultativo, coagulasa positivo.	Gram positivo, anaerobio facultativo.	BAAR positivo, aerobio, ureasa positivo.	Gram positivo, aerobio, poseen extremos abultados en forma de maza y se tiñen de forma irregular

(Continúa en la siguiente página)



	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Forma	Bacilo	Bacilo	Cocobacilo	Bacilo (formas jóvenes son cocobacilar)	Bacilo curvo o recto
Agrupación	cadena cortas o largas	Aislados (sin agrupación definida)	Empaladiza o “letras chinas”	Cadenas o aislados	Aislado, pares o cadenas cortas
Tamaño	1-1.2 μm de diámetro 3-7 μm de largo	Varían en tamaño desde 0.3-1 μm de ancho por 0.6-6 μm de largo	0.5-1 a 1-2 μm	2 μm de largo por 0.5 μm de diámetro	1.5-3.8 μm de largo por 0.5-0.8 μm de diámetro
Movilidad	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
Flagelos	Presente	Ausente	Ausente	Presentes (perítricos)	Presente (polar)
Esporas	Presente	Ausente	Ausente	Ausentes	Ausentes
Cápsula	Ausente	Presente	Presente	Ausentes	Ausentes
Gránulos metacromáticos	Ausentes	Ausentes	Presentes	Ausentes	Ausentes
Otras	Gram positivo Aerobio	Anaerobio facultativo Gram negativo Colonias mucosas en medio sólido	Aerobio estricto Gram positiva	Gram negativo, aerobio y anaerobio facultativo.	Gram negativo, aerobios estrictos, oxidasa positivo, productor de piocianina, entre otros.

Cuadro 23. Características básicas de bacterias empleadas (25, 35, 12, 52, 92,93,94,95, 96, 97, 98).



	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Microsporium canis</i>	<i>Microsporium nanum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Microsporium gypseum</i>
Presencia de macroconidios	Escasos o ausentes	Presentes	Presentes	Escasos o ausentes	Presentes
Forma de macroconidios	Alargados con extremo redondeado, con aspecto de “puro”, de 15 a 20 μm de largo por 4 a μm de ancho (presentadas más en la var. granulosa)	Fusiformes (con forma alargada, elipsoide, y con las extremidades más estrechas que el centro), tabicados. Gran cantidad. De 50-100 μm de largo, 10-20 μm de ancho	Ovalados con forma de clava o maza. Gran cantidad de 12 a 20 μm de largo por 5 a 8 μm de ancho. Membrana delgada.	En forma de “puro”, de entre 20 y 40 μm de largo por 6 a 8 μm de ancho.	Abundantes, elípticos y fusiformes, de entre 50 a 120 μm de largo por 10 a 20 μm de ancho, en forma de huso.
Presencia de microconidios	Presentes	Ausentes	Presentes	Presentes	Escasos o ausentes
Forma de microconidios	Abundantes . Forma de lágrimas. Distribuidos a lado de las hifas. Entre 2 y 4 μm de largo, dispuestos de manera alterna y en menor medida en “Cruz de Lorena”. En las colonias viejas se ven sueltos.	----- -	Escasos, piriformes, sésiles, de 4 a 6 μm de largo.	Redondos o piriformes (los piriformes se presentan en forma alterna o de “Cruz de Lorena”) y agrupados como racimos de uvas o libres. Se presentan en gran cantidad.	Piriformes, de 4 a 6 μm de largo.

(Continúa en la siguiente página)



Presencia de hifas	Presentes	Presentes	Presentes	Presentes	Presentes
Aspecto de hifas	Abundantes, delgadas (var. vellosa), tabicas, de alrededor de 2 μm de diámetro.	Delgadas, tabicadas, ramificadas que le dan aspecto de “árbol” y abundantes. Modalidad de raquetas intercalares, similares a “huesos de perro”.	Escasas, delgado, tabicado.	Abundante, delgado, tabicado. Se suelen presentar zarcillos e hifas en espiral.	Escaso, delgado y tabicado.
Otras	Se presentan dos tipos de cepas: vellosas y granulosas, siendo las más frecuentes las primeras.	Relativamente pleomórfico	Poco pleomórfico	Incluye dos variedades: <i>mentagrophytes</i> e <i>interdigitale</i>	Poco pleomórfico

Cuadro 24. Características básicas de hongos empleados ⁽²⁶⁾.



6.2 Componentes de reactivos de tinción

Tinción de Gram

- Cristal violeta (Colorante primario)

Opción 1 ⁽⁶⁸⁾

Alcohol de 90°

Cristal violeta

Ácido fénico cristalizado

Agua destilada

Opción 2 ⁽³⁵⁾

a. Tinte de cristal violeta (90%)

Etanol (95%)

b. Oxalato de amonio

Agua destilada

*Mezclar la solución “a” con la solución “b”.

- Lugol (Mordente) ^(23,34,65)

Yoduro de potasio (KI)

Cristales de yodo (I)

Agua destilada

- Alcohol acetona (Decolorante)

Opción 1 ⁽³⁵⁾

Etanol (95%)

Nota: Se puede utilizar alcohol al 75% con acetona al 25%, pero se debe de reducir el tiempo de decoloración

Opción 2 ⁽²²⁾

Acetona

Alcohol etílico (95%)

- Safranina (Colorante de contraste)

Opción 1 ⁽⁶⁸⁾

Safranina

Alcohol etílico

Opción 2 ⁽³⁵⁾

Safranina O

Etanol (95%)

Agua destilada

Tinción de Ziehl-Neelsen

- Carbofucsina (Colorante primario) ⁽²²⁾

Cristales de fenol

Alcohol (95%)

Fucsina

Agua destilada

- Alcohol ácido (Decolorante)

Opción 1 ⁽³⁵⁾

Etanol

HCl (concentrado)

Opción 2 ⁽²²⁾

HCl (concentrado)

Alcohol (70%)

- Azul de metileno (Colorante de contraste) ⁽²²⁾

Azul de metileno

Ácido acético glacial

Agua destilada

Tinción de Kinyoun

- Carbofucsina-tergitol (Colorante primario) ⁽³⁵⁾

Fucsina básica

Fenol

Etanol (95%)

Isopropanol

Agua destilada

- -Alcohol ácido (Decolorante) ⁽³⁵⁾

H₂SO₄

Etanol (95%)

Agua destilada



- -Azul de metileno (Colorante de contraste) ⁽³⁵⁾

Cloruro de azul de metileno

Agua destilada

Tinción de Tinta China

- Tinta China ⁽⁹⁹⁾

Negro humo (hollín procedente de hidrocarburos o fragmentos de carbón)

Agua destilada

Tinción de rojo Congo

- Rojo Congo (Colorante) ⁽³⁵⁾

Tinte rojo Congo

Agua destilada

- Mordente de Cápsula (Mordente)

Tinción de Albert

- Colorante de Albert (Colorante) ⁽³⁵⁾

Azul de toluidina

Verde de malaquita

Ácido acético glacial

*Nota: El azul de toluidina tiñe los gránulos metacromáticos de color negro azulado y el verde de malaquita tiñe el resto del cuerpo de la célula de verde ⁽⁴¹⁾.

- Lugol (Mordente) ⁽⁶⁸⁾

Yoduro de potasio (KI)

Cristales de yodo (I)

Agua destilada

Tinción de Loeffler

- Azul de metileno (Colorante)

Opción 1 ⁽⁶⁸⁾

Alcohol

Azul de metileno

Fenol

Agua destilada

Opción 2 ⁽²²⁾

Azul de metileno

Alcohol etílico (95%)

Agua destilada

Tinción de Shaeffer-Fulton

- Verde de malaquita (Colorante primario) ⁽¹⁰⁰⁾

Colorante verde de malaquita

- Safranina (Colorante de contraste) ⁽¹⁰⁰⁾

Safranina

Alcohol etílico

Tinción de azul de algodón lactofenol

- Azul de algodón lactofenol (Colorante) ⁽⁶⁸⁾

Azul de algodón (de anilina) al 1%

Glicerol

Cristales de fenol

Ácido láctico

Agua destilada



6.3 Limitaciones de las técnicas de tinción

Es necesario tomar en cuenta que cada técnica de tinción que se realiza dentro del laboratorio presenta determinadas limitaciones, es por ello que en este apartado se mencionarán algunas de las más relevantes.

Sin importar el tipo de tinción que se esté realizando, es importante aclarar que todas requieren de otras pruebas para establecer un criterio concreto, es decir, con únicamente la realización de una tinción no es suficiente para establecer de cuál microorganismo se trata y mucho menos será suficiente para establecer un diagnóstico.

6.3.1 Tinción de Gram

-La tinción de Gram proporciona información de identificación primaria solamente, y no está diseñada para sustituir los estudios de cultivo de la muestra. Los resultados de tinción de Gram deben confirmarse con procedimientos adicionales tales como análisis directo de antígenos y cultivos de los medios ⁽¹⁰¹⁾.

-Cualquier tratamiento anterior con antibióticos puede hacer que organismos grampositivos de una muestra aparezcan como gramnegativos ⁽¹⁰¹⁾.

-Se aconseja el uso de cultivos de 18 – 24 h para obtener resultados óptimos, dado que las células recientes tienen una mayor afinidad que las células de más antigüedad para la mayoría de los colorantes. Esto se aplica en especial al caso de las bacterias formadoras de esporas, que son fuertemente grampositivas cuando se las examina en cultivos recientes, pero que luego se vuelven gram-variables o grampositivas ⁽¹⁰¹⁾.

-La reacción de tinción de Gram se ve afectada por la alteración física de la pared celular bacteriana o protoplasto. Las paredes celulares de las bacterias grampositivas interponen una barrera que evita la absorción del complejo colorante desde el citoplasma. Las paredes celulares de las bacterias gramnegativas contienen lípidos solubles en disolventes orgánicos, que luego se liberan para descolorar el citoplasma. Por consiguiente, un microorganismo físicamente alterado por exceso de calor no reacciona a la tinción de Gram de la manera prevista ⁽¹⁰¹⁾.

-Los resultados de la tinción de Gram, incluida la morfología del organismo, pueden verse afectados por la antigüedad del aislado, las bacterias que contienen sistemas enzimáticos autolíticos, los cultivos transferidos de medios con antibióticos, además de muestras recogidas de pacientes que reciben tratamiento con antibióticos ⁽¹⁰¹⁾.

-El material de fondo y los artefactos también pueden interferir con la interpretación ⁽¹⁰¹⁾.

-Entre las limitaciones de la tinción de Gram se encuentra que se requiere un número elevado de microorganismos (más de 10⁴ microorganismos/mL). En el caso de muestras biológicas,



como es el caso del líquido cefalorraquídeo, que se trata de una muestra líquida con un número bajo de microorganismos, se tiene que centrifugar para concentrar los patógenos y el precipitado se tiñe y se observa ⁽⁵¹⁾.

-La tinción de Gram en líquido sinovial es de gran utilidad para el diagnóstico rápido cuando es positiva, debido a su alta especificidad, de más del 09%. Sin embargo, se presenta muy baja sensibilidad, de menos del 26% ⁽¹⁰²⁾.

6.3.2 Tinción de Ziehl Neelsen

-Algunos medicamentos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis, hacen perder la ácido-alcohol resistencia de los bacilos, observándose esta característica de las cepas sensibles a la isoniazida y a la alfa etiltioisonicotinamida (ethionamida) ⁽¹⁰³⁾.

-La reacción de coloración de Ziehl-Neelsen se ve afectada por la alteración física de la pared celular bacteriana. Por lo tanto, un microorganismo físicamente alterado por exceso de calor no reacciona a esta tinción de forma prevista. Es importante controlar la fijación con calor debido a que un exceso del mismo puede dar como resultado tinciones erróneas ⁽¹⁰³⁾.

-El agua altamente clorada puede debilitar la coloración de contraste ⁽¹⁰³⁾.

6.3.3 Tinción de Albert

-El agua altamente clorada puede debilitar la coloración de contraste ⁽¹⁰⁴⁾.

Aunque esta tinción es empleada para la diferenciación del bacilo diftérico (*Corynebacterium diphtheriae*) por medio de la observación de los gránulos de este, los gránulos metacromáticos también pueden ser encontrados en otras especies de *Corynebacterium* y ocasionalmente en algunas especies de *Bacillus* ⁽¹⁰⁴⁾.

6.3.4 Tinción de Loeffler

Una tinción excesiva puede reducir el contraste entre los gránulos y el citoplasma o entre las bacterias y el fondo ⁽¹⁰⁵⁾.

-Esta tinción puede ser utilizada en la identificación presuntiva de *Corynebacterium diphtheriae*. Se recomienda realizar estudios bioquímicos adicionales para lograr la identificación completa, porque algunas cepas de *Actinomyces*, *Propionibacterium* y formas pleomorfas de estreptococos pueden evidenciar el aspecto característico de la tinción de *C. diphtheriae* ⁽¹⁰⁵⁾.



6.3.5 Tinción de Tinta china

-Se debe tener cuidado de no malinterpretar las gotas de grasa o los linfocitos en forma de levadura. Las gotas de grasa no tendrán una pared celular bien definida. Los linfocitos tienen un borde peludo y un núcleo excéntrico. Las cápsulas de criptococos generalmente están delineadas y la pared celular de levadura bien definida está ubicada en el centro de la cápsula ⁽¹⁰⁶⁾.

-Los organismos en pacientes con SIDA pueden no tener cápsulas ⁽¹⁰⁶⁾.

-Los frotis de tinta china realizados en sedimento de LCR son positivos en solo el 60% de todos los casos de meningitis criptocócica. Todas las tinciones con tinta china deben complementarse con cultivo o detección antigénica ⁽¹⁰⁶⁾.

-Los frotis de tinta china positivos solo pueden usarse como diagnóstico presuntivo. El diagnóstico definitivo se establece mediante cultivo y / o detección antigénica ⁽¹⁰⁶⁾.

6.3.6 Tinción de azul de algodón lactofenol

Esta tinción es de utilidad para establecer una identificación presuntiva del microorganismo a partir de sus características. Sin embargo, para una identificación completa se recomienda la realización de pruebas bioquímicas y serológicas en colonias aisladas y un estudio de su morfología ⁽¹⁰⁷⁾.

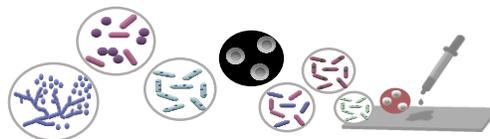


- **Validación del libro “Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología: un enfoque gráfico”**

El cuestionario para la validación del libro “Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología: un enfoque gráfico” se aplicó a 37 alumnos de noveno semestre del área de Bioquímica Clínica de la carrera de Q.F.B. de la FES Zaragoza UNAM y a 3 profesores que imparten la materia de Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas. Este cuestionario consta de 11 preguntas de opción múltiple, en las cuales se preguntan aspectos referentes a las características del libro, además de una pregunta abierta donde alumnos y profesores dan su opinión sobre el libro, así como sus sugerencias para mejorarlo. Es importante mencionar que el mismo cuestionario fue aplicado a alumnos y a profesores. Dicho lo anterior, a continuación se presentan 2 cuadros que muestran de manera general los resultados obtenidos. Posteriormente se muestran los gráficos de cada una de las preguntas que conforman el cuestionario, obtenidas a partir de los mismos.

Alumnos									
Pregunta	Excelente		Bueno		Regular		Malo		% Total
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	
1	24	65	13	35	0	0	0	0	100
2	19	51	18	49	0	0	0	0	100
3	19	51	16	43	2	6	0	0	100
4	22	59	14	38	1	3	0	0	100
5	16	43	20	54	1	3	0	0	100
6	19	51	16	43	2	6	0	0	100
7	19	51	18	49	0	0	0	0	100
8	26	70	9	24	2	6	0	0	100
9	18	49	14	38	5	13	0	0	100
10	26	70	10	27	1	3	0	0	100
11	21	57	16	43	0	0	0	0	100

Cuadro 14. Resultados de cuestionario aplicado a alumnos.



Profesores									
Pregunta	Excelente		Bueno		Regular		Malo		% Total
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	
1	1	33	2	67	0	0	0	0	100
2	1	33	2	67	0	0	0	0	100
3	1	33	2	67	0	0	0	0	100
4	1	33	2	67	0	0	0	0	100
5	1	33	2	67	0	0	0	0	100
6	0	0	3	100	0	0	0	0	100
7	1	33	2	67	0	0	0	0	100
8	0	0	3	100	0	0	0	0	100
9	1	33	2	67	0	0	0	0	100
10	2	67	1	33	0	0	0	0	100
11	1	33	2	67	0	0	0	0	100

Cuadro 15. Resultados de cuestionario aplicado a profesores.

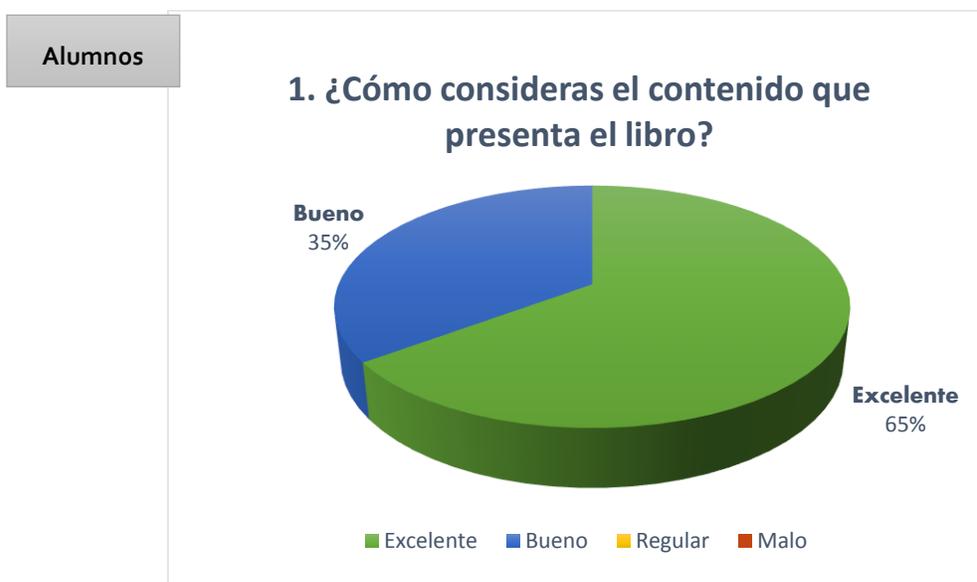


Gráfico 1. Resultados de los alumnos, pregunta 1.

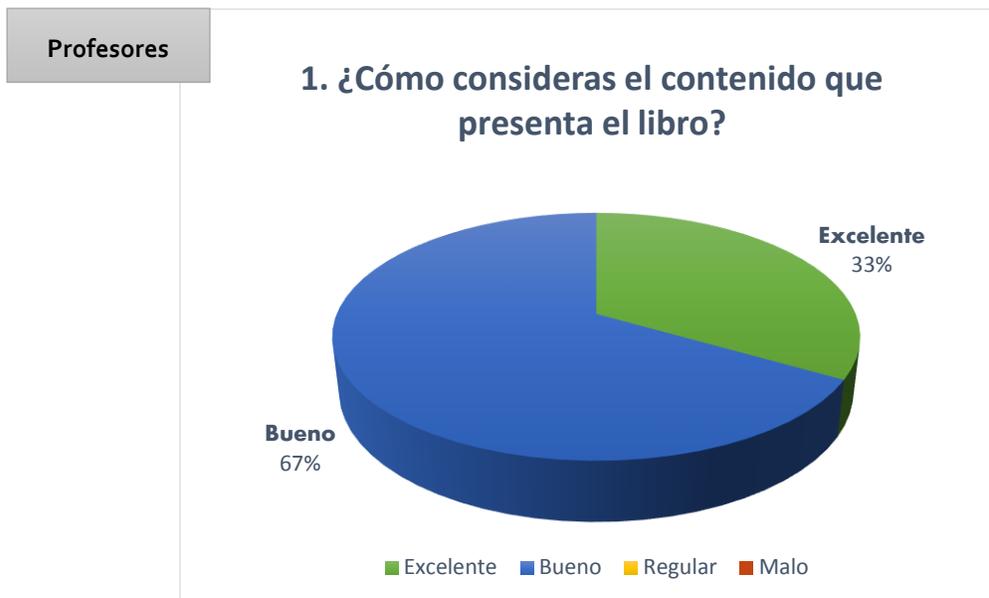
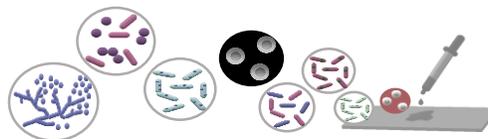


Gráfico 2. Resultados de los profesores, pregunta 1.

En el gráfico 1 se puede observar que la opinión de los alumnos respecto al contenido del libro es del 65% para aquellos que consideran que éste es excelente y del 35% para aquellos que consideran que es bueno, así mismo, ninguno de los alumnos considera que este contenido sea regular o malo. De esta forma, al realizar la suma de los porcentajes “Bueno” y “Excelente” se obtiene un porcentaje total favorable del 100%.

En cuanto al gráfico número 2, haciendo referencia a la misma pregunta, el 33% de los profesores considera como excelente el contenido del libro y el 67% lo considera bueno. Con lo anterior, se obtuvo un porcentaje total del 100% favorable.

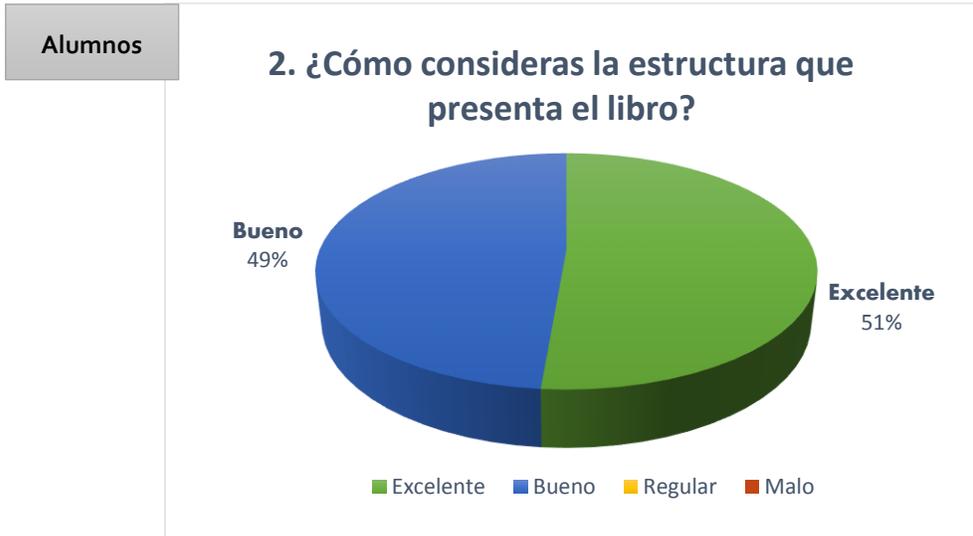
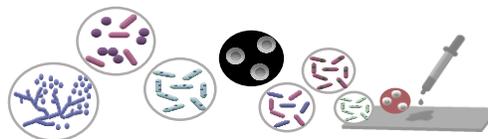


Gráfico 3. Resultados de los alumnos, pregunta 2.

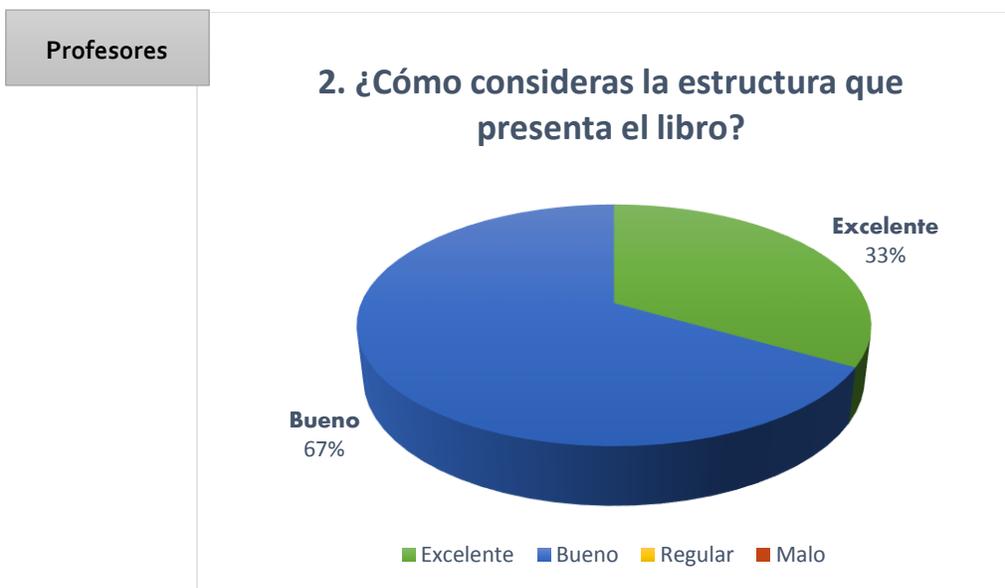
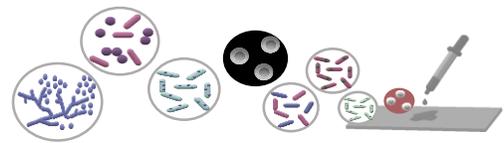


Gráfico 4. Resultados de los profesores, pregunta 2.

Con base en el gráfico número 3, se observa que el 51% de los alumnos consideró como excelente la estructura que presenta el libro y el 49% lo consideró bueno, no existiendo respuestas regulares ni malas. Sumando de esta forma un 100% de respuestas favorables. Para el caso de los profesores con respecto a la misma pregunta, como se puede observar en el gráfico 4, un 33% de estos consideran que la estructura del libro es excelente y el 67% consideran que es buena. De esta



forma, al realizar la suma de los porcentajes “Bueno” y “Excelente” se obtiene un porcentaje total del 100% también.

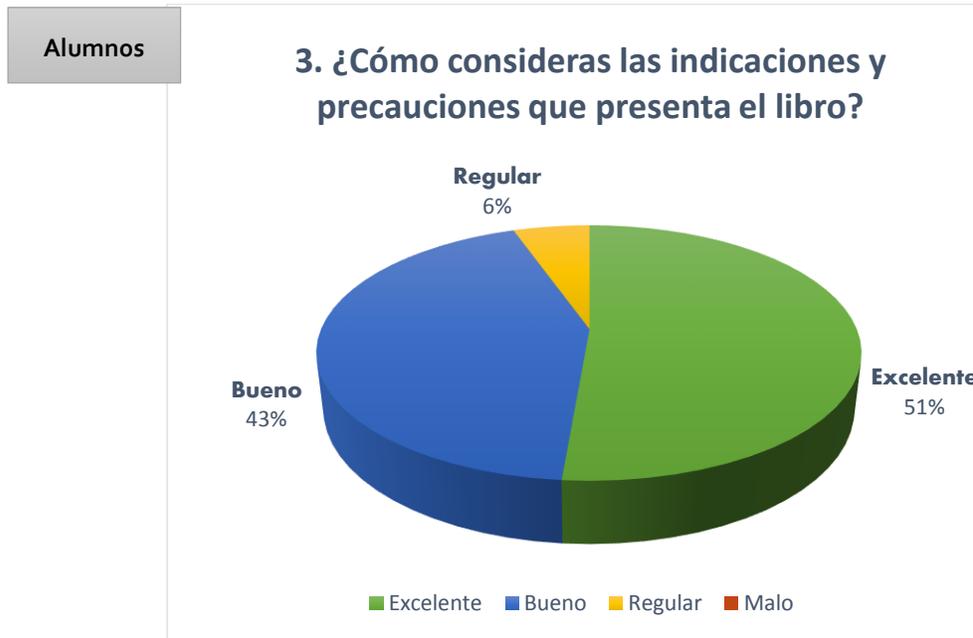
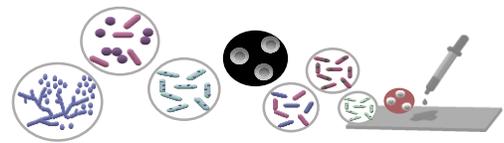


Gráfico 5. Resultados de los alumnos, pregunta 3.



Gráfico 6. Resultados de los profesores, pregunta 3.



De acuerdo al gráfico 5 se observa que el 51% de los alumnos consideraron que las indicaciones y precauciones que presenta el libro son excelentes y el 43% considera que éstas son buenas, así mismo, un menor porcentaje (6%) considera que éstas son regulares y, ninguno de los alumnos considera que éstas sean malas. De esta forma, el porcentaje total favorable para esta pregunta resulta ser del 94%. Así mismo, con respecto a la misma pregunta, pero para el caso de los profesores, como se observa en el gráfico 6, los resultados reflejan que las indicaciones y precauciones del libro son consideradas excelentes en un 33% y buenas en un 67%, sumando de ésta manera 100% de respuestas favorables.

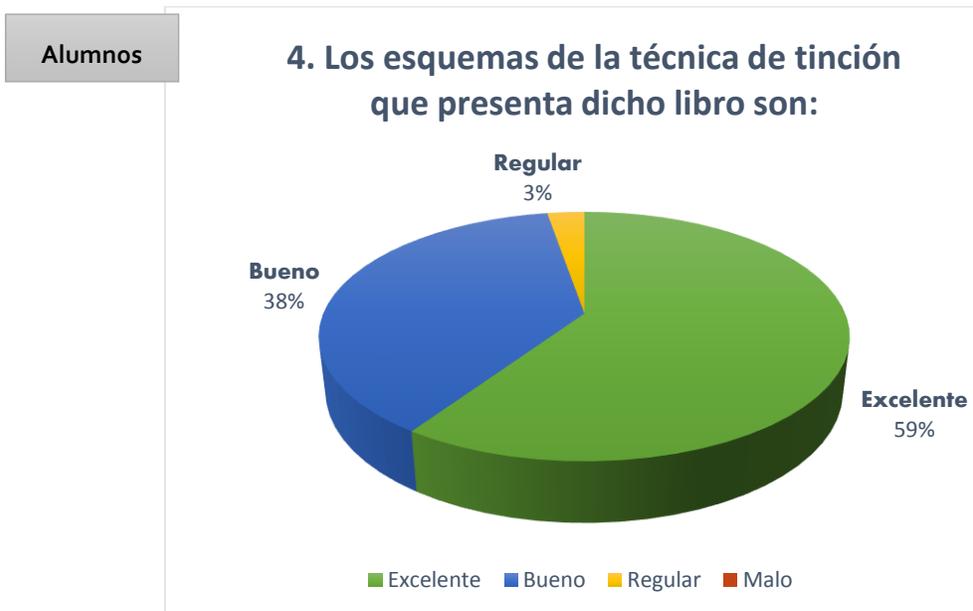


Gráfico 7. Resultados de los alumnos, pregunta 4

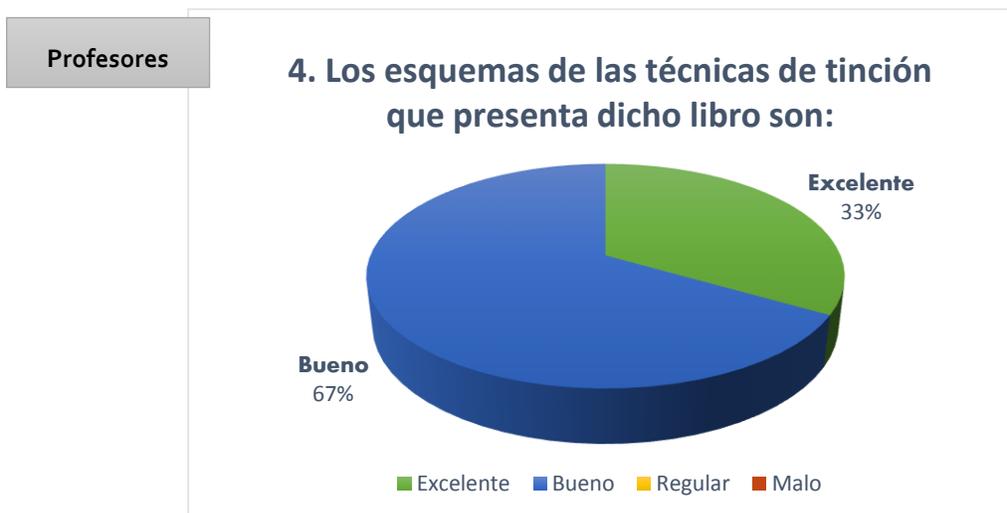
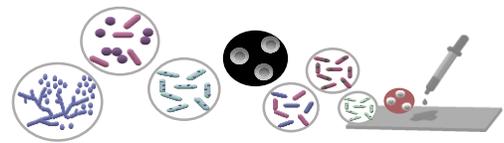


Gráfico 8. Resultados de los profesores, pregunta 4.



Con respecto a los esquemas que se presentan para las técnicas de tinción, el 59% de alumnado consideró que son excelentes, el 38% consideró que son buenas y el 3% optó por considerarlas regulares, sumando de ésta manera un 97% de respuestas favorables, tal como se observa en el gráfico 7.

Con respecto a la misma pregunta, pero para el caso de los profesores, en el gráfico 8 se describen los resultados obtenidos, en el cual se observa que el 33% de éstos consideran que los esquemas son excelentes, el 67% los considera buenos y ninguno considera que sean regulares o malos. De esta forma, al realizar la suma de los porcentajes "Bueno" y "Excelente" se obtiene un porcentaje total favorable del 100%.

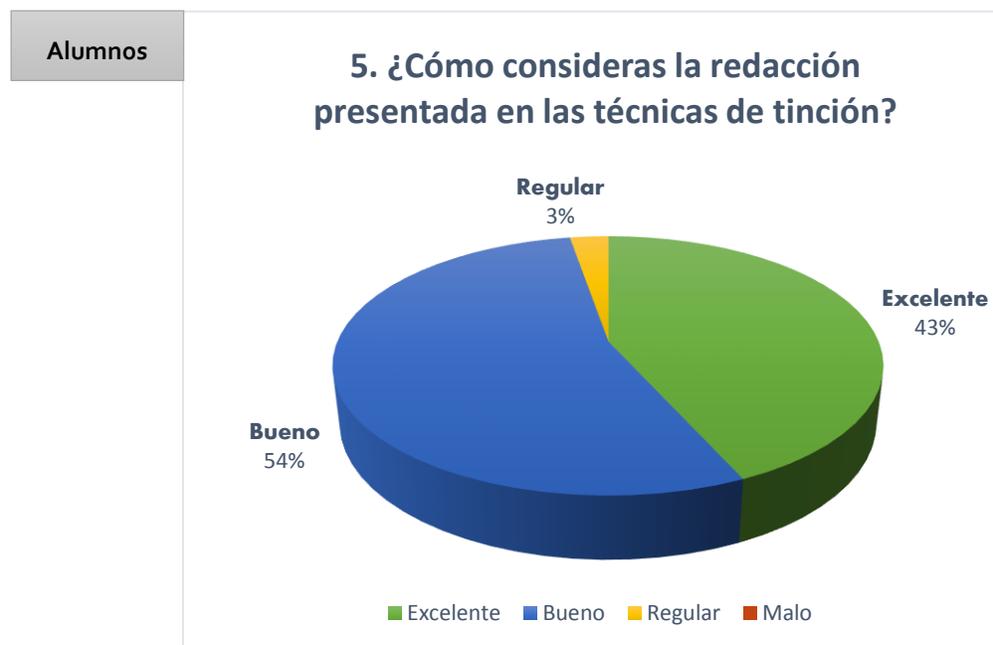
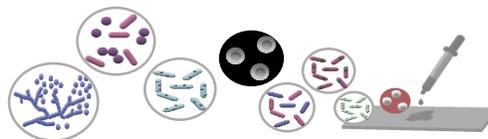


Gráfico 9. Resultados de los alumnos, pregunta 5



Profesores

5. ¿Cómo consideras la redacción presentada en las técnicas de tinción?

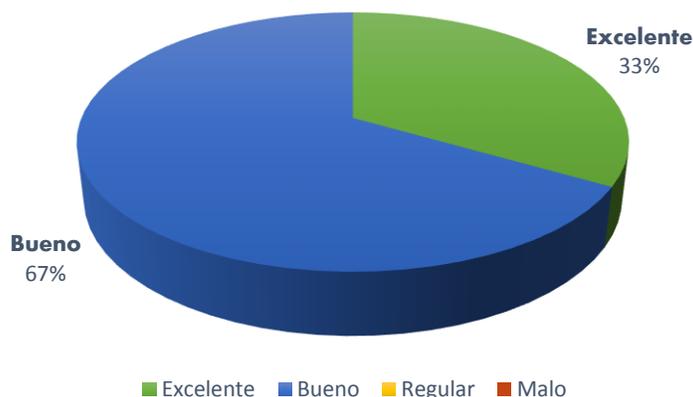
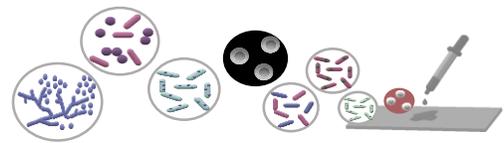


Gráfico 10. Resultados de los profesores, pregunta 5.

Como se observa en el gráfico 9, el 43% de los estudiantes respondió que la redacción presentada en las técnicas les parece excelente, al 54% les parece bueno, al 3% les parece regular y al 0% les parece malo, sumando de ésta manera un 97% de resultados favorables.

Así mismo, los resultados obtenidos para la misma pregunta contestada por los profesores, muestra que un 33% de estos consideran que la redacción presentada en las técnicas de tinción del libro es excelente, 67% consideran que es buena y ninguno de los profesores considera que esta sea regular o mala (gráfico 10), por lo que al realizar la suma de estos porcentajes se obtiene un 100% de respuestas favorables por parte de los profesores.



Alumnos

6. Las imágenes presentadas en los procedimientos de las tinciones son:

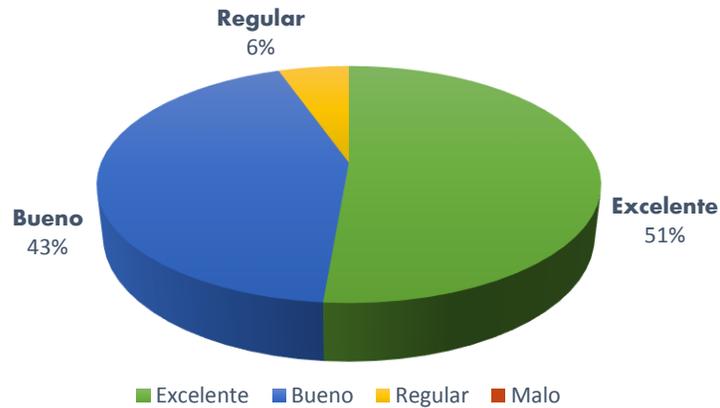
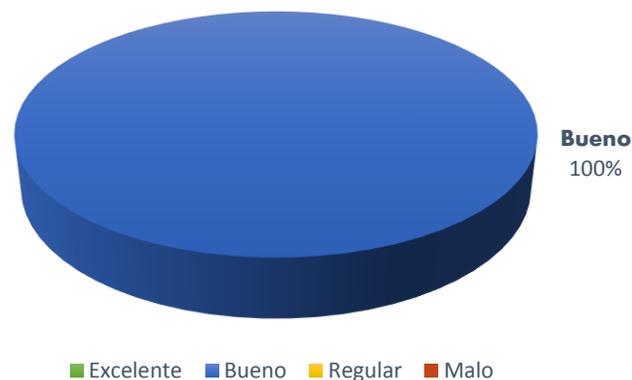


Gráfico 11. Resultados de los alumnos, pregunta 6.

Profesores

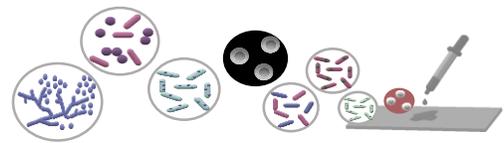
6. Las imágenes presentadas en los procedimientos de las tinciones son:



Gráfica 12. Resultados de los profesores, pregunta 6.

En cuanto a las imágenes presentadas en los procedimientos de las tinciones, de acuerdo con el gráfico 11, se observa que el 51% de los alumnos encuestados las consideró excelentes, el 43% buenas, el 6% regulares y el 0% malas, sumando un 94% de respuestas favorables por parte de los alumnos, para ésta pregunta.

Así mismo, en el caso de la opinión de los profesores, estas imágenes fueron buenas en un 100% como se puede observar en el gráfico 12, por lo tanto, este



mismo porcentaje es el que corresponde al porcentaje de respuestas favorables para esta pregunta, por parte de los profesores.

Alumnos

7. ¿Cómo consideras los apartados que conforman los procedimientos de las tinciones?

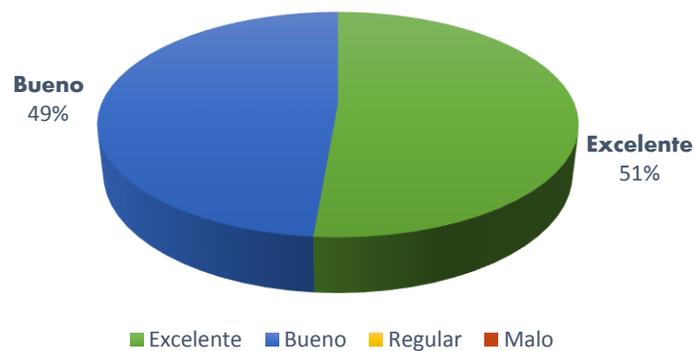


Gráfico 13. Resultados de los alumnos, pregunta 7.

Profesores

7. ¿Cómo consideras los apartados que conforman los procedimientos de las tinciones?

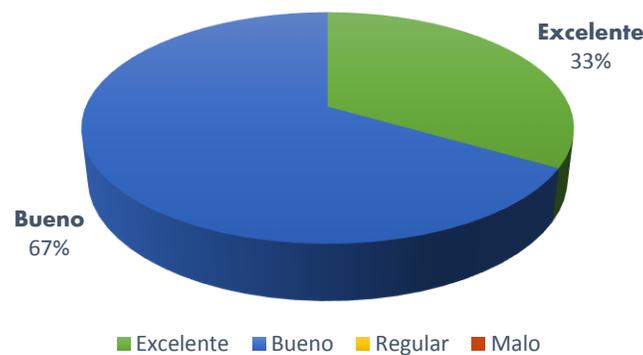
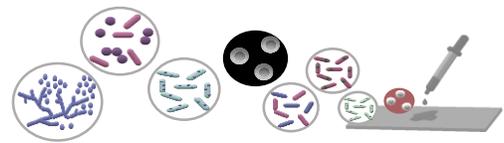


Gráfico 14. Resultados de los profesores, pregunta 7.

Con base en el gráfico 13, se observó que el 51% de los alumnos considera que los apartados que conforman los procedimientos de las tinciones son excelentes, el 49% los considera buenos y el 0% los considera regulares y malos, sumando un



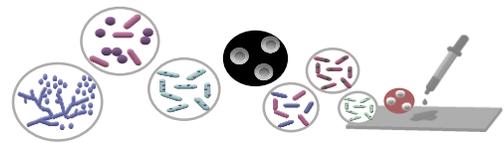
total de 100% de respuestas favorables. También, con respecto a esta pregunta, como se puede observar en el gráfico 14, el 33% de los profesores consideran que los apartados que conforman los procedimientos de las tinciones son excelentes y el 67% considera que estos son buenos, generando también un total del 100% de respuestas favorables.



Gráfico 15. Resultados de los alumnos, pregunta 8.



Gráfico 16. Resultados de los profesores, pregunta 8.



Se colocó una pregunta en el cuestionario sobre cómo consideran los cuadros comparativos de los tiempos empleados por diferentes autores en las técnicas de tinción, aplicándose a alumnos y profesores, obteniéndose por respuesta un 70% para excelente, 24% para bueno, 6% regular y 0% malo (gráfico 15) para el caso de los alumnos y el 100% bueno para el caso de los profesores. Se realizó la suma de los porcentajes "Bueno" y "Excelente" para obtener el porcentaje total favorable, siendo del 94% por los alumnos y del 100 % por parte de los profesores.

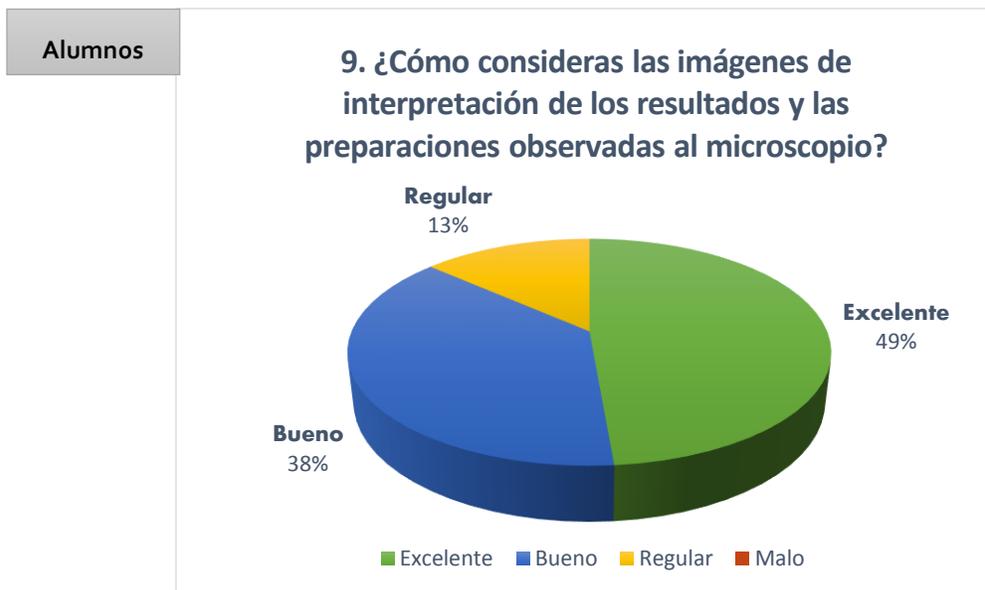
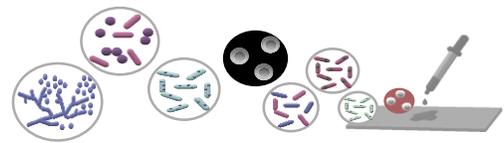


Gráfico 17. Resultados de los alumnos, pregunta 9.



Gráfico 18. Resultados de los profesores, pregunta 9.



De acuerdo con el gráfico 17, se observa que el 49% de los alumnos consideró como excelentes las imágenes de interpretación de resultados junto con sus respectivas preparaciones observadas al microscopio, el 38% las consideró buenas, el 13% regulares y el 0% malas, sumando un total de 87% de respuestas favorables. Para ésta misma pregunta el 33% de los profesores consideraron como excelentes las imágenes de interpretación y preparaciones observadas al microscopio y buenas para el 67%, sumando un total de 100% de respuestas favorables, de acuerdo con el gráfico 18.

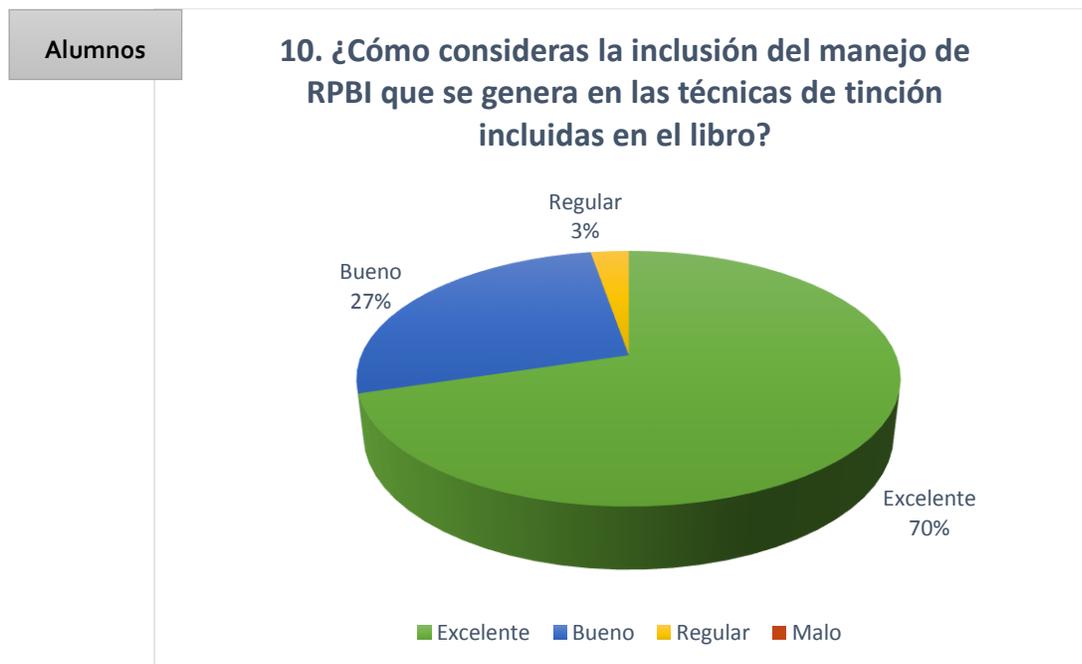


Gráfico 19. Resultados de los alumnos, pregunta 10.

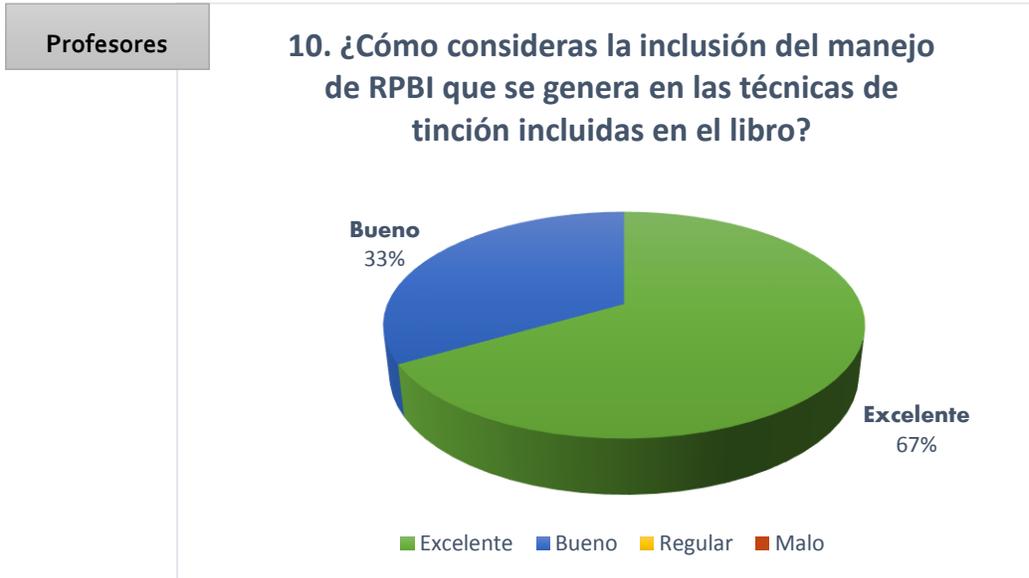
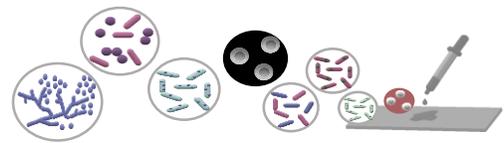
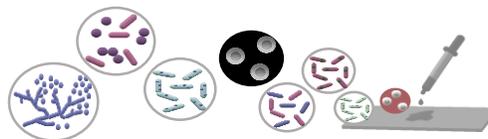


Gráfico 20. Resultados de los profesores, pregunta 10.

De acuerdo al gráfico 19, se observa que el 70% de los alumnos lo consideró excelente, el 27% bueno, el 3% regular y nadie lo consideró malo, sumando un 97% de respuestas favorables. Además, con respecto a esta misma pregunta, pero respondida por los profesores, de acuerdo al gráfico 20, se obtuvo que el 67% de ellos considera que la inclusión de este apartado es excelente y el 33% considera que es bueno, sumando de esta manera un 100% de respuestas favorables.



Gráfico 21. Resultados de los alumnos, pregunta 11.



Profesores

11. De manera general, este libro me parece:

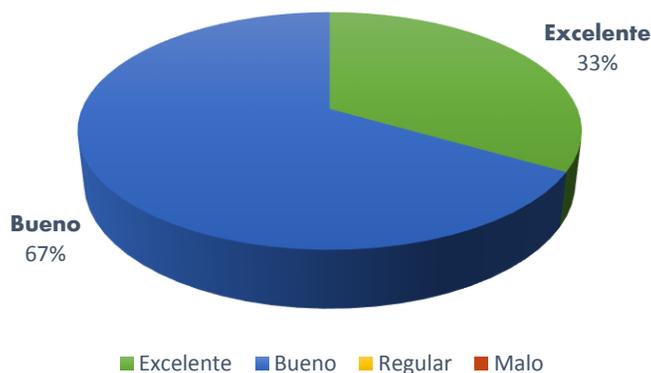
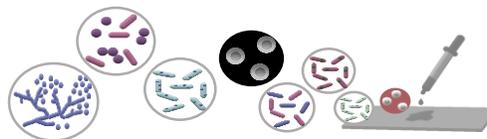


Gráfico 22. Resultados de los profesores, pregunta 11.

Afortunadamente y de acuerdo a como se observa en el gráfico número 11, que trata sobre la opinión general que los alumnos tienen sobre este libro, se obtuvieron resultados satisfactorios, en donde el 57% de ellos dio por respuesta excelente y 43% dio por respuesta bueno, sin obtener respuestas de regular o malo, obteniéndose con ello una opinión general de los alumnos, siendo favorable en un 100%. Con respecto a los profesores, al 33% de éstos el libro les pareció excelente y bueno al 67%, sumando de igual manera un 100% de respuestas favorables.

Finalmente, se consideraron los comentarios y sugerencias planteados en la pregunta abierta que se colocó al final del cuestionario, la cual tiene como objetivo atender las observaciones pertinentes y mejorar las características y utilidad del libro. A continuación, se muestran algunos de los comentarios más relevantes emitidos por los alumnos:

1. "Mejorar la presentación de las imágenes"
2. "Importante agregar información sobre los reactivos"
3. "Indicar cuáles son los pasos críticos para realizar la tinción y que los resultados" sean buenos
4. "Indicar más específico el mecanismo de cada colorante."
5. "Colocar más imágenes y cuadros comparativos y que la información sea tan completa como para presentar un examen"
6. "Mayor extensión sobre el fundamento de cada colorante"
7. "Especificar aún más la utilidad de los reactivos y su mecanismo de acción"



8. "Mejorar los fundamentos y explicar las interacciones que tienen los colorantes con los microorganismos. Características fisicoquímicas de los colorantes"
9. "Las tablas comparativas no son de utilidad para el laboratorio (donde comparan los tiempos de tinciones), tal vez las podrían omitir"
10. "Podrían agregar más tinciones además de las básicas y quizás colocar las tinciones que se observan en otros tipos de microscopios, ya que no lo manejamos en la práctica diario"
11. "Impresión a color y que si lo van a vender en la librería esté siempre disponible. Creo que el formato electrónico no sería adecuado"
12. "Recomienda una segunda parte del libro con pruebas bioquímicas".

Además, resulta satisfactorio tener presente que además de lo anterior, se recibieron varios comentarios positivos y aprobaciones por parte de los alumnos acerca del libro tal como se encontraba al momento de presentárselos.

De igual manera es importante la opinión de los profesores, pues son quienes imparten la materia en cuestión, por lo que sus respuestas abiertas también se han recopilado y se muestran a continuación:

1. "Falta realizar una sección de limitaciones de cada técnica y control de calidad"
2. "Que se incluyera la tinción de flagelos"
3. "Más imágenes o fotografías de las estructuras de los microorganismos".

Además de los porcentajes obtenidos por pregunta (los cuales fueron superior al 80% en todas), se obtuvo el porcentaje general obtenido tanto por alumnos como profesores, observándose un 96% de respuestas favorables, es decir, bueno y excelente, por parte de los alumnos (cuadro 16) y un 100% de respuestas favorables por parte de los profesores que imparten la materia (cuadro 17).

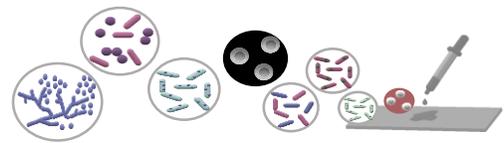


	Excelente (%)	Bueno (%)	Regular (%)
	65	35	0
	51	49	0
	51	43	6
	59	38	3
	43	54	3
	51	43	6
	51	49	0
	70	24	6
	49	38	13
	70	27	3
	57	43	0
Promedios	56	40	4
Suma de Excelente y Bueno	96		

Cuadro 16. Resultados generales obtenidos del cuestionario aplicado a alumnos.

	Excelente (%)	Bueno (%)	Regular (%)
	33	67	0
	33	67	0
	33	67	0
	33	67	0
	33	67	0
	0	100	0
	33	67	0
	0	100	0
	33	67	0
	67	33	0
	33	67	0
Promedios	30	70	0
Suma de Excelente y Bueno	100		

Cuadro 17. Resultados generales obtenidos del cuestionario aplicado a profesores.



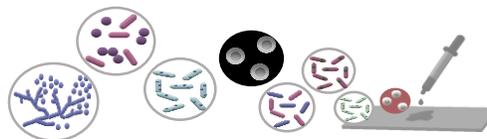
8. Discusión

Por medio de la validación del libro “Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología: un enfoque gráfico” que se realizó mediante la aplicación de un cuestionario a alumnos de noveno semestre del área de Bioquímica Clínica de la carrera de Q.F.B. de la FES Zaragoza UNAM y a profesores que imparten la materia de Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas, fue posible obtener los resultados antes expuestos, observándose que de manera general (cuadros 16 y 17) existe una opinión favorable del material presentado, superior al 80%.

Es importante destacar las bondades que este material presenta. Como primer aspecto, el contenido del libro está conformado por apartados que contienen de forma escrita la descripción de la parte teórica, así como esquemas gráficos de la técnica de tinción y finalmente, también contiene imágenes fotográficas, siendo éstas últimas las que se presentan con mayor frecuencia en el libro, debido a que éste pretende ser un material gráfico, ilustrativo y llamativo para el usuario. Es importante mencionar que la mayor parte de las imágenes que se incluyen, así como la totalidad de las fotografías que ilustran cada paso de los procedimientos de las técnicas de tinción son autoría propia. Así mismo, los esquemas gráficos anteriormente mencionados, son también de autoría propia, en estos se representa la agregación de cada uno de los reactivos empleados y de muestra de forma macroscópica y microscópica lo que ocurre con los hongos o bacterias durante el proceso de tinción, según sea el caso. Dichos esquemas fueron creados con la intención de mejorar y facilitar la comprensión del fundamento de las técnicas de tinción para quienes empleen el libro y así conjuntar ésta con la parte práctica. De igual manera se incluyen esquemas de interpretación de los resultados y fotografías de las correspondientes observaciones al microscopio, ambas de igual manera son de autoría propia.

Además de lo anterior, es importante resaltar que las etapas en que se encuentra dividido el libro lo hace ser más práctico y ordenado (etapas pre-analítica, analítica y post-analítica), así como la implementación del apartado de manejo de RPBI, entre otras características más.

Precisamente, con base en las características anteriormente mencionadas, fue que se realizaron las preguntas del cuestionario que se aplicó a alumnos y profesores, cuyos resultados ya fueron presentados, por lo que sus respectivos análisis se presentan a continuación.

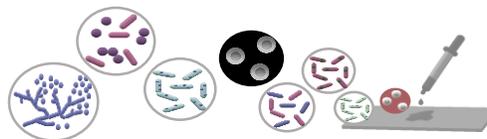


Con respecto a la pregunta 1, en la cual se evalúa el contenido del libro (gráfico 1), se obtuvo un porcentaje del 100% de respuestas favorables por parte de los alumnos en este aspecto, lo cual indica que de manera general la información, así como las imágenes y los temas que contiene el libro son adecuados y de utilidad porque en éste se abordan algunos de los aspectos que se presentan con mayor frecuencia al realizar tinciones básicas en el laboratorio. Respecto al gráfico 2, con referencia a la misma pregunta, pero respondida por los profesores, se obtuvo nuevamente un 100% de respuestas favorables, es importante tomar en cuenta su opinión de estos al ser parte clave en la enseñanza de la materia. Asimismo, esto nos indica que para los profesores el contenido general del libro es apropiado y por lo tanto el manejo del mismo en el laboratorio podría ser de utilidad con fines educativos dado que contiene aquellas tinciones que se emplean y abordan con mayor frecuencia en este y otros módulos previos.

Para la pregunta 2 (gráfico 3 y 4), sobre la estructura del libro, al tener respuestas favorables del 100% tanto por parte de alumnos como profesores, se puede decir que la clasificación en las etapas pre-analítica, analítica y post-analítica son las pertinentes para el libro. Además de que las respuestas favorables se atribuyen a que la estructura general es la que se tiene usualmente al realizar una práctica en el laboratorio, mismas que ya se han mencionado anteriormente.

Por otra parte, para la pregunta número 3 (gráfico 5 y 6), acerca de las indicaciones y precauciones que presenta el libro, se obtuvieron respuestas favorables superiores al 94% y 100% para alumnos y profesores, respectivamente, es decir, que se resalta el valor y la importancia que éstas dentro del laboratorio para mantener la integridad tanto del personal de laboratorio como del trabajo que se está realizando. Asimismo, estas plantean aspectos que deben de ser considerados antes de realizar alguna tinción para la obtención de mejores resultados.

Acerca de los esquemas de la técnica de tinción que se presentan en el libro, pregunta 4 (gráficos 7 y 8), se obtuvo un 97% de respuestas favorables para alumnos y 100% para profesores. Por lo que concierne al 3% del alumnado que no se encuentra dentro de estas respuestas favorables, podría deberse a que algunos alumnos hayan considerado los esquemas de las técnicas de tinción como un contenido extra o sin mucha utilidad, pues con base en las respuestas que se obtuvieron de la pregunta abierta colocada al final del cuestionario, se presentó un comentario en la que se indicó que los esquemas parecían estar dirigidos a un público distinto, es decir, a un público con menor experiencia en el tema, sin embargo, lo que realmente se buscó fue facilitar la comprensión del contenido,

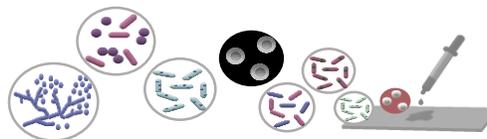


haciéndolo más digerible para quienes lo empleen, tomando en cuenta que se requiere tener un conocimiento previamente adquirido, debido a que estos esquemas no buscan sustituir la información presentada de forma escrita, sino, por el contrario, son herramientas para complementar dicha información. Además, es importante tomar en cuenta los esquemas se pueden emplear también como un apoyo para dar una introducción general al tema de la tinción en cuestión y generar desde un inicio algún interés en los alumnos, por lo tanto, los esquemas no deben ser considerados como un contenido sin importancia, además de que, por parte de los profesores existieron comentarios y/u opiniones bastante favorables.

Referente a la redacción presentada en las técnicas de tinción, pregunta 5 (gráficos 9 y 10), se obtuvo un 97% de resultados favorables por parte de los alumnos y 100% por parte de los profesores. En este sentido, la redacción de las técnicas de tinción es otro punto importante que se consideró debido a que si éstas están bien redactadas serán de fácil entendimiento y realización, además de que las imágenes servirán de apoyo para cada descripción. Ésta pregunta puede dar pie a diversas acepciones acerca de la palabra "redacción" por parte de los encuestados, pues podrían estar considerando que una mala redacción del libro se deba a que alguna descripción no concuerde con la imagen y esto podría causar confusión, también podrían referirse a la apariencia visual de lo redactado o, referirse a la redacción como tal, sin embargo, esto último no sería muy factible porque la redacción fue revisada antes de presentar el libro, además de a que a los alumnos se les presentó el libro mediante exposición por tratarse de un material inédito. En este sentido, resulta complicado determinar exactamente qué fue lo que al 3% de los alumnos hizo que les pareciera regular, debido a que, a diferencia de éstos, para los profesores, los resultados fueron favorables en este aspecto.

En cuanto a las imágenes presentadas en los procedimientos de las tinciones, de la pregunta 6, correspondiente a los gráficos 11 y 12, se obtuvo un 94% de respuestas favorables por parte de los alumnos y 100% por los profesores, por lo que se puede decir que el hecho de que las imágenes presentadas para los procedimientos sean consideradas como regulares para un 6% por parte de los alumnos puede deberse a diversos aspectos, entre ellos, la nitidez, el tamaño, la iluminación, etc.

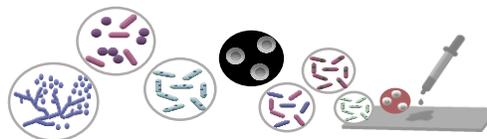
Con respecto a la pregunta 7, sobre los apartados que conforman los procedimientos de las tinciones (gráficos 13 y 14) suma un total de 100% de respuestas favorables, tanto por parte de alumnos como de profesores. En este sentido, es importante mencionar que las etapas que conforman la estructura del libro abordan desde una preparación previa con las indicaciones y precauciones



generales, así como una parte teórica de las tinciones y los procedimientos de las técnicas de tinción como tal y, finalmente, los aspectos a considerar una vez realizadas las tinciones, es decir, el desecho de los residuos generados, siendo este último aspecto uno de los más relevantes del libro, pues en contraste a otros materiales semejantes disponibles en internet y demás fuentes de información, generalmente no cuentan con este apartado. Con respecto a las indicaciones y precauciones presentes en el libro, estas son apropiadas y deben ser tomadas en cuenta siempre, debido a que éstas tienen el propósito de prevenir aspectos o situaciones de riesgo a las que pudiera verse expuesto el personal del laboratorio que está en contacto con agentes nocivos para la salud. Con este apartado dentro del libro, se busca presentar aquellos aspectos importantes a tomar en cuenta antes de realizar el procedimiento, presentándose de una forma visual, considerando que por medio de las imágenes es posible dar un mayor entendimiento de aquello que se describe textualmente. También se debe considerar que las indicaciones y precauciones abordadas en el libro son las mismas que muchas veces son enfatizadas por los profesores en el laboratorio.

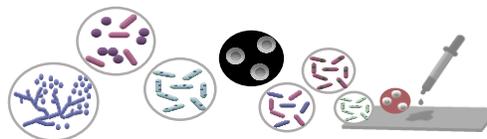
Referente a lo mencionado anteriormente, se debe destacar la importancia de diferenciar las etapas que conlleva una tinción, es decir, primero se lleva a cabo la preparación de la muestra, posteriormente la realización de la tinción como tal y al final la observación al microscopio, es decir, una vez distinguidas éstas etapas será más sencillo para el usuario del libro determinar qué paso de cada etapa se está realizando. Dichas etapas se presentan en todos los procedimientos con sus respectivas imágenes, sin excluir alguna de ellas a pesar de ya haber sido abordadas con anterioridad en tinciones previas, pues se considera necesario retomar todas las fases para tener con ello una estructura más ordenada del procedimiento, una secuencia más clara y así mismo facilitar al usuario la realización de la misma, cubriendo con ello aspectos que a pesar de que podrían considerarse repetitivos en diversas tinciones, deben ser siempre tomados en cuenta con el fin de evitar errores en las mismas. Considerando lo anterior, los resultados obtenidos tanto para profesores como para alumnos muestran que es apropiado incluir las diferentes etapas que conforman el procedimiento, ya que cada una de estas tiene detalles importantes que podrían influir en el resultado final de la tinción.

Un aspecto a resaltar de este libro y que lo hace diferente a otros documentos semejantes disponibles en internet y otras fuentes de información, son los cuadros comparativos que se colocaron en cada técnica de tinción. Dichos cuadros contienen los diversos tiempos y técnicas que emplean diferentes autores para la



realización de cada tinción, lo cual se hizo con la finalidad de proporcionar al usuario del libro el sustento de las técnicas y las referencias bibliográficas de las cuales se obtuvo la información, así mismo, algunos de estos tiempos y técnicas fueron modificados en el laboratorio en el que se trabajó, debido a que se realizaron mediante ensayo y error, de acuerdo a las condiciones y reactivos con los que se cuentan en la facultad, además de que se buscó que fueran técnicas de tinción óptimas, es decir, realizarlas en el menor tiempo posible y con calidad. Por lo tanto, fue necesario colocar una pregunta al respecto en el cuestionario sobre los cuadros comparativos de los tiempos empleados por diferentes autores en las técnicas de tinción, la cual corresponde a la pregunta 8 (gráficos 15 y 16), de la cual se obtuvo un porcentaje total favorable del 94% por los alumnos y del 100% por parte de los profesores. Estas respuestas nos indican la importancia de estos cuadros comparativos al proporcionar una herramienta útil en su mayoría para quienes empleen el libro, sin embargo, el 6% de los alumnos que respondió regular, al cotejar con las opiniones abiertas fue posible percatarse de que algunos de estos consideran que no son de utilidad en el laboratorio y sugieren que podrían omitirse, posiblemente porque consideran que sólo les es útil dejar los tiempos que se usan en específico para el Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas, sin embargo, en nuestro objetivo se plantea que este libro sea de utilidad para alumnos, profesores y demás personal afín al área de las Ciencias Químico Biológicas, es decir, no sería adecuado limitarse a los tiempos planteados en el libro porque este también podría ser empleado en otros laboratorios del área y, en dado caso de que no les sean de utilidad los tiempos seleccionados pueden optar por probar otros tiempos de los indicados y referenciados en las tablas comparativas, lo cual les ahorraría significativamente el tiempo de búsqueda en la bibliografía pudiendo ser tomados en cuenta como un sustento de los diferentes tiempos que se emplean en las tinciones, además de que muchas veces estos tiempos son variables debido a los reactivos, las condiciones con las que se cuenta, entre otros aspectos.

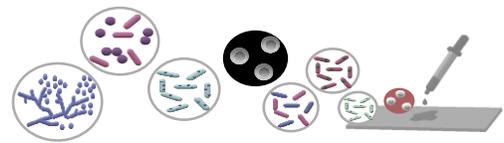
Con respecto a la pregunta 9 (gráficos 17 y 18), sobre las imágenes de interpretación de los resultados y las preparaciones observadas al microscopio, se obtuvo un total de 87% de respuestas favorables por parte de los alumnos y 100% por los profesores. Se considera que el porcentaje favorable es relativamente bajo por parte de los alumnos (87%), lo cual pudo deberse a la nitidez o iluminación de las fotografías, o a la forma en que se presentaron, entre otras causas. Posiblemente los alumnos esperaban mayor nitidez en las fotografías, sin embargo, esto no es siempre posible considerando el microscopio y cámara empleados para su realización, incluso puede deberse hasta cierto punto a la falta de experiencia



por parte de los alumnos encuestados para reconocer la calidad de las imágenes, pues la opinión de los profesores resultó bastante favorable en este sentido.

Asimismo, con respecto a los resultados anteriormente descritos, es importante resaltar que hay una contradicción importante entre los resultados obtenidos por los profesores y los obtenidos por los alumnos, porque los primeros (profesores) dieron una respuesta favorable del 100%, mientras que los segundos (alumnos) del 87%. Para ello se debe tomar en cuenta que la percepción de alumnos y profesores, en cuanto al aspecto que deben tener las preparaciones y las interpretaciones gráficas de las mismas, puede ser muy diferentes debido a la cantidad de experiencia y práctica que poseen cada uno de ellos. Las imágenes de interpretación fueron colocadas al final de cada procedimiento de tinción, tanto con fotografías como con esquemas gráficos, ambas de autoría propia. Además de lo anterior, en el caso de esta pregunta, resulta complicado distinguir a qué le hacen mayor hincapié con sus respuestas (tanto alumnos como profesores), por una parte, puede ser que les den mayor peso a las imágenes de interpretación gráfica o a las fotografías de las preparaciones observadas en el microscopio. Con base en los resultados obtenidos para esta pregunta, se realizaron las modificaciones pertinentes para mejorar el aspecto visual de dichas imágenes, debido a que son parte fundamental para complementar la comprensión de las descripciones de las interpretaciones para cada microorganismo que se emplea en las respectivas técnicas de tinción.

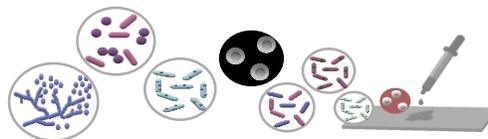
Por lo que respecta a la pregunta 10, sobre la inclusión del manejo de RPBI que se genera en las técnicas de tinción incluidas en el libro (gráficos 19 y 20) se obtuvo un 97% de respuestas favorables por alumnos y del 100% por profesores. En este sentido, la inclusión del manejo de RPBI que se generan en las técnicas de tinción, es de mucha relevancia puesto que en la mayoría de los materiales semejantes a éste como manuales, insertos, etc., generalmente solo se maneja el aspecto de cómo realizar la tinción, es decir, los procedimientos como tal, pero no se manejan las indicaciones previas a realizar la tinción ni las actividades posteriores a ésta, como lo es la clasificación y envasado de los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI). Dichos resultados representan un alto porcentaje favorable tanto por parte de los alumnos como por parte de los profesores, lo que permite considerar como correcta la inclusión de este apartado, pues se trata de un aspecto que debe ser aplicado frecuentemente en el laboratorio, debido a que un buen manejo de residuos asegurará un buen desecho de éstos y a su vez, se podrán evitar accidentes, además de procurar ser lo más amigables posibles con el medio ambiente, todo esto mediante el seguimiento de la normatividad vigente en el país.



Con lo que respecta al 3% del alumnado que optó por elegir como regular la inclusión de éste apartado en el libro, podría deberse a que no se ha fomentado tanto la importancia del tema de manejo de RPBI, pues lamentablemente en la actualidad, la mayoría de los estudiantes únicamente se enfoca en la realización de la práctica de laboratorio y obtención de resultados, pero no han reflexionado lo suficiente con respecto a lo que ocurre con el medio ambiente y los desechos que se generan al finalizar algún procedimiento en el laboratorio.

Finalmente, con respecto a la pregunta 11 (gráficos 21 y 22), acerca de la opinión general de este libro, se obtuvo un 100% de respuestas favorables por parte de alumnos y profesores. Es importante destacar que a ninguno les parece regular o malo, es decir, que las opiniones generales de los profesores y alumnos nos indican que el libro es de utilidad y cumple en general con los aspectos evaluados. Además, con respecto a aquellos aspectos que nos mencionaron necesitaban ser mejorados, estos han sido atendidos en la media de lo posible.

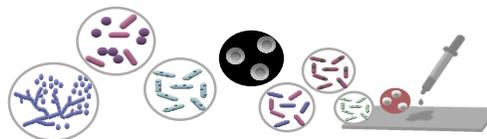
Con el propósito de mejorar el libro, fueron tomados en cuenta los comentarios realizados, tanto por alumnos como por profesores (localizadas en el apartado de "Resultados"), sin embargo, algunas de estas opiniones fueron descartadas debido a la falta de viabilidad que presentaban, tal es el caso de la sugerencia número 2 de los profesores, en la que se sugiere incluir la tinción de flagelos, pero debido a la falta de reactivos que requiere ésta tinción, ya que no se encuentran destinados al laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas, no es posible colocarla, además de que no se agregaron más técnicas de tinción porque éste material está enfocado en las tinciones básicas para éste módulo, es decir, de Bacteriología y Micología, por lo que tinciones como la de Giemsa y Wright, entre otras, no fueron incluidas por tal motivo. De igual manera, se descartó parcialmente la sugerencia número 1 de los profesores que establece realizar una sección de limitaciones de cada técnica y control de calidad, debido a que en las "Notas" que se incluyen después de cada técnica de tinción incluye este tipo de observaciones, es decir, contiene las aclaraciones para realizar mejor cada técnica, así como ciertas limitaciones con respecto a la técnica de tinción en cuestión. Por lo que respecta al aspecto de control de calidad, este ya es tomando en cuenta por medio de la estructura que se le da al libro (basada en el uso de las etapas pre-analítica, analítica y post-analítica ya mencionadas previamente) y el empleo de cepas ATCC, ya que ambos aspectos constituyen herramientas que permiten tener un mejor control del proceso realizado y aseguran la obtención de resultados confiables, tomando en cuenta esto no se consideró pertinente colocar una sección en particular para ello.



Con respecto a las opiniones de los alumnos, las últimas cuatro, fueron descartadas debido a que no podían colocarse fotografías de microorganismos observadas en otros microscopios porque para este módulo únicamente se encuentran disponibles los microscopios que se usaron, es decir, los microscopios ópticos de campo claro. Además, de que no se pensó en realizar una impresión a color de los libros porque resulta más práctico tener el material digital para el alumno (para tenerlo disponible en todo momento en su dispositivo) y es menos costoso de esta manera y también con el fin de cuidar del medio ambiente (evitando el uso de hojas). Por otra parte, no se pueden omitir las tablas comparativas de tiempos y técnicas de tinción debido a que son un elemento clave del libro por la utilidad significativa de poder emplear otros tiempos y/u otras técnicas en dado caso de que las establecidas no les sean de utilidad, pues como ya se ha mencionado anteriormente, éste material puede ser de utilidad tanto para personas dentro de la institución como fuera de ésta. Finalmente, con respecto a éstas opiniones, no es factible realizar una segunda parte del libro con pruebas bioquímicas porque este proyecto únicamente está enfocado en la realización de material sobre técnicas de tinción, en dado caso se podría hacer posteriormente un seguimiento a éste proyecto, pero sin perder de vista el rubro de las técnicas de tinción, por lo que correspondería a un proyecto totalmente diferente hacer un libro con pruebas bioquímicas.

Además del análisis de los resultados obtenidos por medio de los cuestionarios aplicados a alumnos y a profesores para valorar la utilidad del libro elaborado, se realizó también una comparación con diversos materiales semejantes (libros, artículos, manuales, etc.) disponibles en internet y otras fuentes de información. Lo anterior mencionado se realizó mediante la elaboración de un cuadro comparativo (anexo 1), en el que se observa que en la mayoría de los casos, los materiales consultados no cuentan con un apartado de "Manejo de RPBI", pues a pesar de que en la mayoría si cuentan con un apartado de "Medidas de bioseguridad", se deja de lado la clasificación y manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos de acuerdo con la normatividad por lo que, al no contar con este apartado, mucho menos cuentan con las fotografías correspondientes.

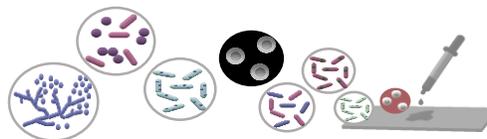
En cuanto al aspecto de "Indicaciones y precauciones" en la mayoría de los casos este no aplica, como es el caso del "Manual de prácticas de la materia de enfermedades bacterianas de los animales domésticos" de la Universidad Autónoma de Aguascalientes ⁽⁷⁹⁾, así como en el de Orozco MG, Murray RM, et al., en su material "Estrategia didáctica para la práctica de laboratorio de microbiología" ⁽⁸⁰⁾, de igual forma con Vázquez C, Silóniz MI en su documento de "Técnicas básicas



de microbiología. Observación de bacterias”⁽⁸¹⁾, así como de López LE, Hernández M, et al, con su documento “Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología”⁽⁵⁵⁾; de Olivas E, Alarcón LR con su “Manual de Prácticas de microbiología básica y microbiología de los alimentos”⁽⁸²⁾ y para el caso de García A, Zamudio MM, con su “Manual de microbiología médica”⁽⁷⁵⁾. En general, la mayor parte del material consultado se enfoca en sólo colocar la parte del procedimiento de la técnica de tinciones. No obstante, hay excepciones, por lo que en algunos sí se mencionan y, en otros más se menciona de manera parcial, es decir, con ciertas deficiencias y en un apartado no especificado, como tal es el caso del “Manual de microbiología general”, de Reynoso M, Magnoli C, y Barros G⁽⁸³⁾. Es importante mencionar que a pesar de que, en algunos materiales, dichas indicaciones y precauciones se presentan, en ninguno de ellos se muestran fotografiados o ilustrados, excepto en el material de la "Society for General Microbiology" (SGM)⁽⁵⁰⁾, donde se muestran parcialmente fotografiados.

Con respecto al fundamento teórico de la tinción, en la mayoría de los casos aplica, sin embargo, hay excepciones en las que no aplica o aplica parcialmente. En el caso del manual que se emplea para sexto semestre de la carrera de QFB de la FES Zaragoza, “Manual de Laboratorio Microbiología General I”⁽⁸⁴⁾, únicamente se cuenta con una breve introducción al tema sin mencionar el fundamento como tal, por lo que este libro podría ser de utilidad para complementar dicha información. En el caso del “Manual de Prácticas de microbiología básica y microbiología de los alimentos” de Olivas E, Alarcón LR⁽⁸²⁾, y en el libro de “Prácticas de microbiología” de Sanz SA⁽⁸⁵⁾., aplica parcialmente, es decir, que sólo en algunas tinciones aparece el fundamento, mientras que en las otras no. Para este aspecto, es importante recalcar la importancia que tiene que el alumno y/o demás personal al área conozca y entienda el fundamento correspondiente a cada una de las tinciones, lo cual servirá de pauta para saber por qué se realiza cada paso de la tinción.

En cuanto a los esquemas de procedimientos, en la mayoría de los casos aplica parcialmente porque únicamente se observa que se realizan dichos esquemas para ilustrar el procedimiento de la etapa de preparación de la muestra, pero no para todo el procedimiento de la técnica de tinción, así mismo, en algunos casos sólo se hizo para muy pocas tinciones y no para todas las que incluye el respectivo documento, como es el caso de “Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología” de López LE, Hernández M⁽⁵⁵⁾, et al., del documento de “Microbiología general para investigaciones de laboratorio” de Silverio CC⁽⁸⁶⁾., así como del “Manual de prácticas de la materia de enfermedades bacterianas de los animales domésticos”

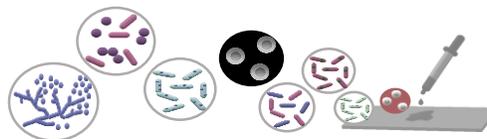


de la Universidad Autónoma de Aguascalientes ⁽⁷⁹⁾ y del documento de “Estrategia didáctica para la práctica de laboratorio de microbiología” de Orozco MG, Murray RM, et al ⁽⁸⁰⁾.

Los cuadros comparativos que empleamos en este libro no fueron encontrados en ningún otro tipo de material, lo cual junto con otras características lo hace ser un material inédito. Es necesario remarcar que estos cuadros comparativos de los diferentes tiempos y técnicas empleadas para cada tinción son de importancia y de gran utilidad porque sirven de guía para quienes empleen el libro, en dado caso de que alguna técnica de las establecidas no les funcionen correctamente, pues como ya se ha mencionado, las técnicas colocadas fueron seleccionadas y/o modificadas mediante ensayo y error, con base en las condiciones y reactivos con que se cuentan en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, destinadas a la carrera de Q.F.B., pero no se descarta la posibilidad de que éste libro pueda ser empleado por demás personal afín al área de las Ciencias Químico Biológicas fuera de ésta institución, por lo que sus condiciones y reactivos pueden cambiar, por lo que estos cuadros les permitirán optar por alguna otra técnica y/o tiempos de reactivos en caso necesarios, además de que les permitirá ahorrar tiempo para consultar otra bibliografía.

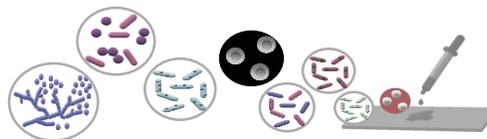
Entre otro de los aspectos evaluados en el cuadro comparativo se encuentra el apartado del procedimiento de la tinción en el cual se incluyen diferentes aspectos a considerar. El sustento bibliográfico es uno de los aspectos más fundamentales dentro de este apartado debido a que éste da confiabilidad en el método que se emplea y asegura la obtención de un resultado óptimo, porque proviene de fuentes de información confiables, además de que han sido consultadas previamente y han sido evaluadas minuciosamente para su posterior selección. Es importante mencionar que, ninguno de los procedimientos de los documentos consultados presenta el sustento bibliográfico que se empleó en cada una de las tinciones presentadas, por lo que no es posible saber el origen de dichos procedimientos, así como de los tiempos de tinción empleados en los mismos, lo que no permite tener una confiabilidad absoluta de las técnicas descritas. Para este punto, es importante aclarar que éste apartado es diferente al colocado al final del cuadro comparativo, en el cual hace referencia únicamente a la “bibliografía” utilizada de manera general para todo el documento emitido.

Así mismo, en este apartado de procedimientos, se revisó que existiera un listado para los materiales, reactivos, equipos y aparatos, así como cepas a emplear, considerando que éstos deberían encontrarse de forma separada, es decir, sin



combinar algún grupo con otro, con el objetivo de tener mayor orden y entendimiento de los elementos que se emplean para realizar la tinción requerida. Además de esto, se evaluó que cada listado tuviera su respectiva imagen (es), en donde se pudieran observar claramente los elementos empleados y que de ésta manera coincidiera la parte escrita con la visual. Con respecto a lo anterior y, como se puede observar en el cuadro comparativo, casi todos los materiales consultados y comparados carecen de dichas listas individuales, debido a que en su mayoría vienen en combinación con otras, es decir, no hay una separación y orden para el material, cepas, reactivos, equipos y aparatos empleados, o en su defecto, no están presentes en todas las tinciones que se abordan y, lo mismo ocurre con sus fotografías correspondientes. Resultó interesante encontrar que en el "Manual de Laboratorio Microbiología General I" de la UNAM, FES Zaragoza ⁽⁸⁴⁾ los listados sí vienen de manera individual, pero tampoco incluye la imagen correspondiente. Una de estas listas refiere el uso de cepas ATCC (American Type Culture Collection) de forma parcial para las técnicas de tinción, siendo éste el único documento en el que se encontraron. Para este aspecto, cabe destacar que el empleo de cepas ATCC es de importancia debido a que su uso fue incluido en este libro porque aseguran la calidad de los resultados obtenidos en la tinción, pues al tratarse de microorganismos de referencia aseguran la identidad del microorganismo (características fenotípicas y genotípicas identificadas) y, por lo tanto, son empleadas para asegurar el control de calidad en procesos microbiológicos.

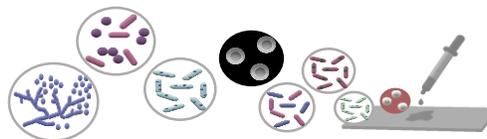
Por otra parte, también se revisó que el procedimiento se encontrara numerado, estableciendo de esta forma una secuencia lógica y ordenada. También se revisó que estuvieran especificadas y descritas las diferentes etapas que se presentan en las técnicas de tinción y que, además de tener la descripción del proceso a realizar presentaran su respectiva imagen (fotografía) y, de ésta manera pudiera presentarse un material que cubriera aquellos aspectos que podrían causar duda o confusión a la persona que quisiera emplear dicho procedimiento por contar solo con la parte escrita. Dicho lo anterior, en muchos de los casos la numeración de los procedimientos y la división de la tinción por etapas estaban presentes, aunque de forma irregular, es decir, había tinciones en un mismo material que contaban con esta numeración y otras que no, como sucede con el material de Orozco MG, Murray RM, et al. ⁽⁸⁰⁾ con "Estrategia didáctica para la práctica de laboratorio de microbiología" y, el documento de López LE, Hernández M, et al. ⁽⁵⁵⁾ con "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología". Para el caso de los documentos no numerados, se encuentra el de Vázquez C, Silóniz MI ⁽⁸¹⁾ con "Técnicas básicas de microbiología. Observación de bacterias" y, el documento de



la Universidad Nacional de Colombia, Montoya OI ⁽⁸⁷⁾ con su “Manual de microbiología”.

En el caso de las etapas de la tinción éstas se presentaban de forma no secuencial o simplemente no se presentaban, pues en la mayoría de los casos se describe el proceso de tinción sin tomarlas en cuenta o incluyéndose sin diferenciación alguna dentro del mismo proceso. La diferenciación de estas etapas es importante porque por una parte debe ser realizada la preparación de la muestra (fijación, preparación de suspensión, etc.) y, por otra parte, deben realizarse las tinciones como tal (agregación de reactivos como colorantes, mordentes, decolorantes, etc.) y deben reconocerse como tal. En cuanto al empleo de fotografías en el procedimiento, estas no están presentes en casi ninguno de los documentos y, únicamente se encontró que los materiales “Técnicas básicas de microbiología. Observación de bacterias” de Vázquez C, Silóniz MI ⁽⁸¹⁾ y “Microbiología general para investigaciones de laboratorio” de Silverio CC ⁽⁸⁶⁾ cuentan con éstas de manera parcial, es decir, que se encuentran únicamente en algunas de las tinciones que abordan y, por lo tanto, no hay un formato constante.

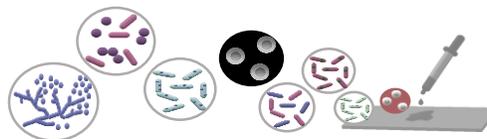
Con respecto al apartado de “Observación de la tinción”, se evaluaron tres aspectos que se considera son fundamentales para una comprensión clara de los resultados obtenidos a partir de la tinción previamente realizada. El primero de estos es la imagen de la preparación (fotografía), la cual otorga una referencia visual del microorganismo, así como las características de éste. De igual manera, este apartado permite aclarar las interrogantes que puedan surgir sobre lo que se va a observar una vez terminada la tinción. En relación a lo anterior mencionado y considerando lo presente en el cuadro comparativo presentado previamente, se puede observar que la mayoría de los materiales revisados no incluyen éstas fotografías y únicamente fueron encontradas en los materiales “Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología” de López LE, Hernández M, et al. ⁽⁵⁵⁾ “Estrategia didáctica para la práctica de laboratorio de microbiología” de Orozco MG, Murray RM, et al. ⁽⁸⁰⁾ “Técnicas básicas de microbiología. Observación de bacterias” de Vázquez C, Silóniz MI ⁽⁸¹⁾ “Manual de prácticas de la materia de enfermedades bacterianas de los animales domésticos” de la Universidad Autónoma de Aguascalientes ⁽⁷⁹⁾ y “Manual de microbiología general” de Reynoso M, Magnoli C, Barros G, Demo M ⁽⁸³⁾ (en este únicamente de forma parcial, es decir, que no en todas las tinciones). El otro aspecto a considerar es la descripción y/o interpretación esquemática de la preparación, debido a que la inclusión de ambos aspectos en el libro pretende mostrar de manera visualmente atractiva aquellas características que



podrían ser de difícil interpretación únicamente con la parte descrita, la cual a su vez pretende cubrir aquellos aspectos que requieren ser descritos con mayor detenimiento. El aspecto anteriormente mencionado, fue incluido en algunos de los casos, en su mayoría de manera únicamente descriptiva. El último aspecto que conforma este apartado son las notas aclaratorias, las cuales fueron colocadas en el libro al final de cada tinción, las cuales pueden contener algunos aspectos importantes a considerar o aclaraciones del procedimiento que son específicas de cada tinción. En cuanto a los materiales que contienen las características anteriores, se encontraron únicamente dos, los cuales son; “Conceptos y práctica de microbiología general” de Rojas A ⁽⁸⁸⁾ y “Basic Practical Microbiology” de la Sociedad General de Microbiología (SGM) ⁽⁵⁰⁾. Cabe resaltar que el conjunto de los tres aspectos mencionados es importante porque conforman la última fase para obtener un buen resultado y, por lo tanto, una tinción adecuada.

El último apartado incluido en el libro fue el de manejo de RPBI generado, en el cual se abordan aquellos aspectos teórico-prácticos que se deben realizar posteriormente a la realización de la tinción, con el fin de darle la debida atención a los residuos que se hayan generado, aplicando siempre la normatividad vigente, es decir, que éste tiene como objetivo brindar criterios que protejan la salud del personal que esté en contacto con reactivos, sustancias o microorganismos que puedan ser nocivos para la salud y el medio ambiente. Los aspectos comparados en este apartado están conformados por el procedimiento para el manejo de los residuos, tanto de manera escrita como con su respectiva imagen (fotografía). Cabe mencionar, que de entre todos los materiales revisados muy pocos contaron con algunos de los aspectos incluidos en el apartado del libro, dichos materiales fueron; “Microbiología general para investigaciones de laboratorio” de Silverio CC ⁽⁸⁶⁾ “Protocolo de prácticas. Microbiología Experimental” de la UNAM (Facultad de Química) ⁽⁸⁹⁾ y el “Manual de Laboratorio Microbiología General I” de la UNAM (FES Zaragoza) ⁽⁸⁴⁾, las cuales contenían únicamente una descripción escrita de cómo manejar los desechos generados sin incluir imágenes fotográficas de los mismos, además de que los dos primeros materiales anteriormente mencionados no contaban con un sustento normativo vigente.

Para finalizar, se debe tomar en cuenta que, en todos los casos, los materiales consultados contaban con la bibliografía consultada pero no emplearon las etapas pre-analítica, analítica y post-analítica, las cuales conforman todo el proceso realizado en el laboratorio y mediante las cuales se mantiene un control de calidad adecuado en dichos procesos, proporcionando de esta manera resultados confiables.



9. Conclusiones

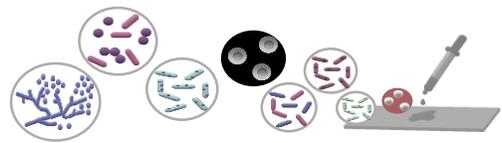
Es importante reconocer la riqueza que posee éste libro, pues de acuerdo a las características didácticas que posee, tales como los esquemas de la técnica de tinción macroscópica y microscópica, así como los esquemas de interpretación de las mismas y la variedad de colores que se incluyen, facilita más la comprensión del fundamento y del procedimiento de dichas técnicas de tinción. Así mismo, es importante destacar el apartado de clasificación y manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) considerando la normatividad vigente en el país, es decir, la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, debido a que forma parte de las actividades que deben realizarse cuando se emplea material biológico, en este caso, con las cepas que se emplearon para cada tinción con el fin de contribuir en la prevención de riesgos contra la salud y al cuidado del medio ambiente al disminuir en la medida de lo posible los desechos generados. A esto se suma la colocación de las etapas que están conformadas por las actividades realizadas en el laboratorio, es decir, las etapas o fases pre-analítica, analítica y post-analítica, por medio de las cuales es posible tener un mayor control de calidad de los resultados obtenidos.

También cabe resaltar la optimización que se realizó en cuanto a las técnicas de tinción seleccionadas y modificadas, pues se buscó que éstas pudieran ser realizadas en el menor tiempo posible y que fueran de calidad, además se colocaron notas aclaratorias de aspectos que podrían generar errores con la finalidad de que el resultado de las técnicas de tinción fuera el adecuado

En cuanto a los resultados obtenidos de la validación de este libro, resultó satisfactorio conocer que se obtuvo un porcentaje de resultado favorable por parte de los alumnos del 96% (cuadro 16) y en el caso de los profesores del 100% (cuadro 17), cumpliéndose con la hipótesis planteada al inicio de este trabajo en donde se esperaba una respuesta favorable de profesores y alumnos de noveno semestre del módulo de Bacteriología y Micología Médicas a los cuales se les aplicó el cuestionario, superior al 80%.

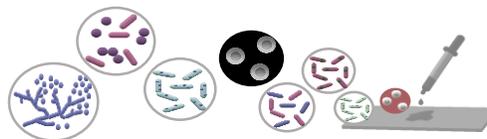
Fue de esta forma como se cumplió de manera satisfactoria con los objetivos planteados al inicio de este trabajo:

- Elaborar un libro de las tinciones básicas empleadas en Microbiología médica del área de bioquímica clínica, con información de fácil comprensión y manejo que sirva de apoyo al estudiante.



- Proporcionar la fundamentación teórica y procedimientos a seguir en cada una de las tinciones con ilustraciones.
- Validar la utilidad del libro de tinciones básicas mediante la opinión de los alumnos del noveno semestre del módulo de Bacteriología y Micología Médica de la Carrera de Q.F.B.

Por medio de la validación del libro “Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología: un enfoque gráfico” se ha conocido la opinión general de los alumnos y profesores, de la cual se determinó que éste material inédito es de utilidad para la comprensión del proceso de las técnicas de tinción básicas en Microbiología que se emplean muy comúnmente en el laboratorio para el módulo de Bacteriología y Micología Médicas.



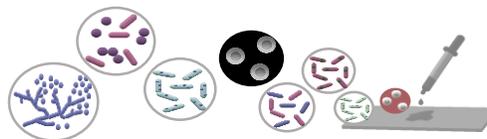
10. Perspectivas

Los resultados obtenidos con la elaboración de este libro, abren un nuevo panorama para la elaboración de otros materiales con contenido semejante, es decir, con un enfoque gráfico, en el que se puedan conjuntar con la parte escrita, siendo elaborados con el fin de dar un mayor entendimiento a otros procesos en el laboratorio que así lo requieran. En este sentido, es importante considerar que el presente libro no pretende limitar a posteriores trabajos que puedan derivarse del mismo o que sean elaborados con el mismo fin, sino que por el contrario, éste pretende impulsar la elaboración de contenido cada vez más llamativo, de utilidad, que puedan ser empleados como herramientas con fines didácticos y educativos, en los que se aborden procedimientos realizados en el laboratorio posiblemente desde otra perspectiva, pero sin alterar el sustento bibliográfico del cual provienen.

Lo anterior significa que puede abordarse la continuación de este material de diversas maneras, por ejemplo, desde la elaboración de otro libro y/o manual que no abarque únicamente tinciones básicas, sino que pueda abarcar otro tipo de tinciones. Así mismo, éste libro también da pie a realizar material audiovisual (videos) en el que se empleen las fotografías que presenta en él, con el fin de que los alumnos, profesores y demás personal afín al área de las Ciencias Químico Biológicas puede hacer uso de estos y la comprensión de los temas sea cada vez más sencilla.

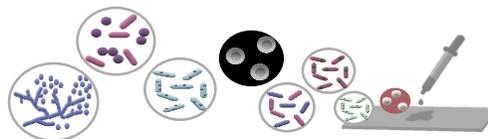
Así mismo, se espera que éste libro y el material que pueda derivarse de él, por su contenido y presentación vistosa se dirijan no únicamente al público que ya cuenta con conocimientos previos de los temas que se abordan, sino que también vaya dirigido a todo aquél que comienza a tener un acercamiento referente a dichos temas.

La importancia de continuar elaborando material semejante a éste es la posibilidad de que al tener mayor contenido gráfico se puedan abordar de manera más detallada aquellos aspectos que muchas veces no se consideran de importancia pero que repercuten en los resultados obtenidos en el laboratorio, también se pueden cubrir aquellas dudas que surjan durante los procedimientos teniendo como referencia tanto imágenes fotográficas, así como las elaboradas a computadora, todo esto sin dejar de lado la parte teórica, que le da una mayor comprensión a la técnica de tinción por realizar, acompañado de un sustento bibliográfico.

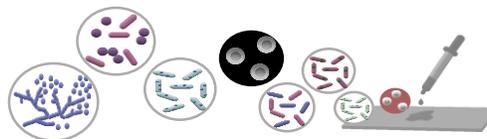


11. Referencias

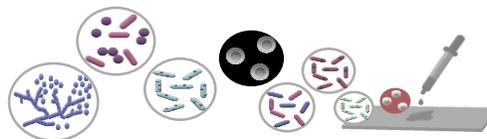
1. Microbiology Society. Introducing microbes [Internet]. UK: Microbiology society; 2018 [citado el 16 de diciembre del 2018]. Disponible en: <https://microbiologyonline.org/about-microbiology/introducing-microbes>
2. Britannica. The importance of bacteria to humans [Internet]. Reino Unido: Encycloaedia Britannica; 2018 [citado el 17 de diciembre del 2018]. Disponible en: <https://www.britannica.com/science/bacteria/The-importance-of-bacteria-to-humans>
3. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. Nature [Internet]. 2007 Oct [citado el 15 de diciembre de 2019]; 449(18): 811-818. Disponible en: http://fire.biol.wvu.edu/cmoyer/zztemp_fire/biol405_F09/papers/Dethlefsen_human%20microflora%20review_nat07.pdf
4. Kumar A, Chordia N. Role of microbes in human health. Appl Microbiol [Internet]. 2016 Apr [citado el 18 de diciembre del 2018]; 3(2): 2-4. Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/role-of-microbes-in-human-health-2471-9315-1000131.php?aid=88460>
5. Pelczar MJ, Pelczar RM. Microbiology [Internet]. Reino Unido: Encycloaedia Britannica; 2018 [citado el 15 de diciembre del 2018]. Disponible en: <https://www.britannica.com/science/microbiology>
6. Samiksha S. Microorganisms: definition, types and importance [Internet]. s/f [citado el 16 de diciembre del 2018]. Disponible en: <http://www.yourarticlelibrary.com/micro-biology/microorganisms-definition-types-and-importance-with-figure-biology/26396>
7. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock, Biología de los microorganismos. 10ª ed. Buenos Aires: Pearson Educacion; 2004.
8. Sánchez RM, Oliva NR. Historia del microscopio y su repercusión en la Microbiología. Rev Hum Med [Internet]. 2015 [citado el 3 de enero del 2019]; 15(2): 355-372. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=60492>
9. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 5ª ed. Barcelona: Elsevier; 2005.



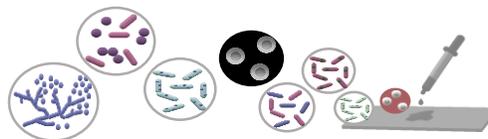
10. Cobos JA. La historia del microscopio (Segunda parte). Ciencia y hombre, Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana [Internet]. 2012 [citado el 4 de enero de 2019]; 25 (2). Disponible en: <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num2/articulos/microscopio/>
11. Montoya VH. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2ª ed. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia; 2008.
12. Pelczar MJ, Chan EC. Elementos de microbiología. México: McGraw-Hill; 1984.
13. American Society for Microbiology, Murray PR, Baron EJ. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington, DC: Editorial ASM Press; 2003.
14. Nikon. Contraste [Internet]. 2019 [citado el 23 de julio de 2019]. Disponible en: http://www.tecnicaenlaboratorios.com/Nikon/Info_contraste.htm
15. Stainer RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR. Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2005.
16. Gamazo C, López I, Díaz R. Manual práctico de microbiología. 3ª edición. Editorial Masson. Barcelona. 2005.
17. Vives JL. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 3ª ed. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica; 2006.
18. Gama MA. Biología 1 biogénesis y microorganismos. 2ª ed. México: Editorial Pearson Prentice Hall; 2004.
19. UBA. Normas para el uso correcto del microscopio [Internet]. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2012 [citado el 28 de diciembre del 2018]. Disponible en: http://materias.df.uba.ar/f2bygAa2013c1/files/2012/07/gu%C3%ADa7_labo_microscop%C3%ADa_avanzada.pdf
20. BVS. Manual de parasitología. Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas [Internet]. Honduras: Biblioteca Médica Nacional; 2013 [citado el 3 de enero del 2019]. Disponible en http://www.bvs.hn/Honduras/Parasitologia/ManualParasitologia/flash/files/res/downloads/page_0037.pdf
21. Nuffield Foundation. Ciencia combinada guía del profesor 3. Madrid: Editorial Reverté; 1974.



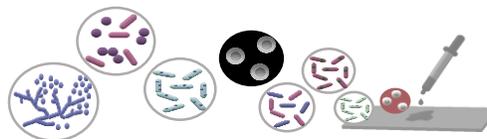
22. Castro AM. Bacteriología médica basada en problemas. 2ª ed. México: Manual Moderno; 2014.
23. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, et al. Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas a color. 6ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006.
24. Uribe SA. Reino monera [Internet]. Medellín; s/f [citado el 29 de junio del 2019]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/biocienciasdesamuel/-reino-monera>
25. Barreto G, Rodríguez H. La capsula bacteriana, algo más que una estructura no esencial. Rev. de producción animal [Internet]. 2007 [citado el 1 de abril del 2019]; 20(1): 69-80. Disponible en: <https://go.galegroup.com/ps/anonymouse?id=GALE%7CA466298107&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=02586010&p=AONE&sw=w>
26. Granados R, Villaverde C. Microbiología: Tomo I. Madrid: Parainfo; 2003.
27. Bonifaz A. Micología médica básica. 5ª ed. México: McGrawHill; 2015.
28. Biblio3. Hongos [Internet]. 2011 [citado el 17 de mayo del 2019]. Disponible en: <http://biblio3.url.edu.gt/Libros/2011/bot/19.pdf>
29. Red Interamericana de Laboratorios de Salud Animal. Manual ilustrado de técnicas de laboratorio utilizadas en bacteriología y micología veterinarias. México: RILSA; 1988.
30. Mier T, Toriello C, Ulloa M. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio. México; Universidad Autónoma Metropolitana; 2002.
31. Pérez A. Identificación fenotípica y genotípica de aislados clínicos de dermatofitos procedentes de Guatemala [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014. 66 p.
32. Díaz H. Caracterización morfológica y molecular de dermatofitos procedentes de México y Costa Rica [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014. 49 p.
33. Delgado A, Prieto S, Amich S, Salvo ML. Laboratorio de microbiología. Nueva York: McGraw-Hill Interamericana; 1994.
34. Canese A, Canese A. Manual de microbiología y parasitología médica. 7ª ed. Asunción: Arquimedes Canese; 2012.
35. Ramos J. Infectología clínica. 2ª ed. México: Manual Moderno; 2012.
36. Prats G. Microbiología clínica. Madrid: Médica Panamericana; 2005.
37. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2009.



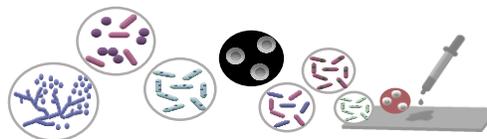
38. Lamanna C, Mallette MF, Zimmerman LN. Basic Bacteriology. 4th ed. Baltimore: The Williams and Wilkins Company; 1981.
39. Granados R, Villaverde MC. Ciencias de la salud: Microbiología. Madrid: Paraninfo; 1997.
40. Corcuera MT, Alonso MJ, Roldán M. Modificación de la técnica de Ziehl-Neelsen para la detección de micobacterias con la utilización de microondas [Internet]. 1996 [citado el 31 de agosto del 2018]; 29(1): 33-35. Disponible en: <http://www.conganat.org/seap/revista/v29-n1/6.pdf>
41. Montalvo CE. Técnica histológica [Internet]. 2010 [citado el 25 de julio de 2019]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf
42. Manacorda AM, Cuadros DP, Álvarez AS. Manual Práctico de Microbiología y Parasitología [Internet] 2007 [citado el 23 de julio de 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/15024971/Cap-5-Coloraciones>
43. Morales GI, Castro G, Mendoza YC, Rubiano LA, Pacheco JM. Una mirada rápida al control de calidad interno en el quehacer diario del laboratorio de microbiología. Revista Medicina y Laboratorio. [Internet] 2017 [citado e 23 de julio de 2019]; 23 (9-10): 459-474. Disponible en: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/05/883832/control-de-calidad-lab-microbiologia.pdf>
44. Porres N, Ruiz E. Microbiología clínica. Madrid: Parainfo; 2018.
45. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiología. 5ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2004.
46. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la Microbiología. 9ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.
47. INR. Manual básico de bioseguridad en laboratorios del INR [Internet]. México: Instituto Nacional de Rehabilitación (INR): 2009 [citado el 3 de marzo del 2019]. Disponible en: <http://www.inr.gob.mx/Descargas/MOP-SIB-04.pdf>
48. Saludgobmx. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo [Internet]. México: Secretaría de Gobernación (SEGOB): 2003 febrero [citado el 3 de marzo del 2019]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>
49. Vasanthakumari R. Practical microbiology. New Delhi: BI Publications Pvt Ltd; 2009.



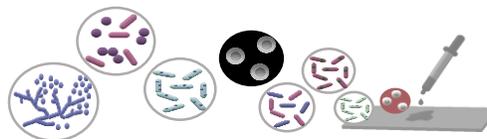
50. Society for General Microbiology (SGM). Basic Practical Microbiology. UK: SGM; 2006.
51. García B, Rubio F, Crespo MR. Técnicas de análisis hematológico. Madrid: Paraninfo; 2015.
52. Rubio F, García B, Carrasco M. Fundamentos y técnicas de análisis hematológicos y citológicos. Madrid: Paraninfo; 2004.
53. Olivas E. Manual de prácticas de microbiología: programa de entrenamiento deportivo. Ciudad Juárez: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez; 2001.
54. Aristegui B. *Microsporum canis* (Bodin) [Internet]. 2017 [citado el 23 de julio de 2019]. Disponible en: <http://hongos-alergicos.reviberoammicol.com/files/033.PDF>
55. López LE, Hernández M, Colín CA, Ortega S, Cerón G, Franco R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en discapacidad [Internet]. 2014 enero [citado 14 mayo 2019]; 3(1): 10-18. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>
56. Arenas R. Micología médica ilustrada. 5ª ed. México: McGraw-Hill; 2014.
57. UGR. Observación de hongos de interés industrial [Internet]. Granada: Universidad de Granada. s/f [citado el 31 de enero del 2019]. Disponible en: <https://www.ugr.es/~cjl/hongos.pdf>
58. Brock T, Brock K, Ward D. Basic Microbiology with applications. 3rd ed. E.U.A: Prentice-Hall; 1986.
59. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Procop GW, et al. Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas color. 5ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2003.
60. Forbes BA, Sahm D, Weissfeld A. Bailey & Scott Diagnóstico microbiológico. 12ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
61. Harvey RA, Champe PC. Microbiología. 2ª ed. Baltimore: Wolters kluwer; 2007.
62. Cordeiro AB, Daza CA, Alves AC, Yumi C, Batista GH, Heinemann MB, et al. Identification of *Mycobacterium* species and *Rhodococcus equi* in peccary lymph nodes. Tropical animal health and production [Internet]. 2018 Mar [citado el 2 de abril del 2019]; 50(6): 1319-1326. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-018-1562-2>
63. Uribarren T. Tuberculosis [Internet]. México: UNAM, depto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina; 2011 [citado el 24 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/tuberculosis.html>



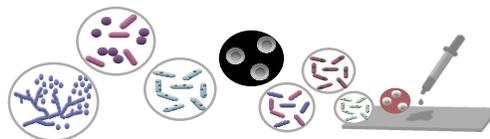
64. De Naranjo PJ, Rodríguez G, Rodríguez J, Caldas ML. La coloración de Ziehl-Neelsen en histopatología. *Biomédica* [Internet]. 1988 [citado el 1 de abril del 2019]; 8(3-4): 84-93. Disponible en: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1964>
65. Rodríguez E, Gamboa M, Hernández F, García J. *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 2005.
66. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. *Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica*. 25ª ed. México: McGraw-Hill; 2011.
67. Witkowski L, Rzewuska M, Takai S, Kizerwetter-Świda M, Kita J. Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* in slaughtered swine, cattle and horses in Poland. *BMC Microbiology* [Internet]. 2016 May [citado el 2 de abril del 2019]; 16(1): 98-104. Disponible en: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-016-0712-9>
68. Rofe AP, Davis LJ, Whittingham JL, Latimer-Bowman EC, Wilkinson AJ, Pryor PR. The *Rhodococcus equi* virulence protein VapA disrupts endolysosome function and stimulates lysosome biogenesis. *MicrobiologyOpen* [Internet]. 2016 Oct [citado el 2 de abril del 2019]; 6(2): 1-17. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mbo3.416>
69. Giles C, Vanniasinkam T, Ndi S, Barton MD. *Rhodococcus equi* (Prescottella equi) vaccines; the future of vaccine development. *Equine veterinary journal* [Internet]. 2015 Sept [citado el 2 de abril del 2019]; 47(5): 510-518. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24945608>
70. Goldman E, Green LH. *Practical Handbook of Microbiology*. 3rd ed. New York: CRC Press; 2005.
71. Leboffe MJ, Pierce BE. *Microbiology: Laboratory Theory and application, essentials*. 3th ed. United States of America: Morton publishing; 2008.
72. Galindo ES, León AM, Pila R, Ramírez O, Morell AM. Meningoencefalitis causada por *Cryptococcus neoformans*: presentación de un caso. *Cubana Neurol Neurocir* [Internet]. 2014 [citado el 30 de enero de 2019]; 4(2):148–52. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubneuro/cnn-2014/cnn142j.pdf>
73. Castañón LR. Criptococosis [Internet]. México: UNAM; 2015 [consultado el 02 de abril de 2019]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/criptococosis.html>



74. Barcia V, Sánchez SE. Utilidad de la prueba de tinta china como tamizaje para meningitis por *Cryptococcus spp.* Revista Ciencia UNEMI [Internet]. 2016 septiembre [citado el 2 de abril del 2019]; 9(20): 63-67. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5774761>
75. García A, Zamudio MM. Manual de microbiología médica. 2ª ed. México: PAPIME-UNAM; 2010.
76. Troya S. Tinción de la cápsula bacteriana. [Internet] Panamá. 2013 [consultado el 30 de enero del 2019]. Disponible en: <http://microbiologiaulat2013.blogspot.com/2013/12/tincion-de-la-capsulabacteriana.html>
77. Ryan KJ, Ray G. Microbiología médica de Sherris. 5ª ed. México: McGraw-Hill; 2011.
78. Kumar S. Essentials of Microbiology. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2016.
79. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Agropecuarias Medicina Veterinaria y Zootecnia. Manual de prácticas de la materia enfermedades bacterianas de los animales domésticos. Aguascalientes: UAA; 2007.
80. Orozco MG, Murray RM, Murray VA, Murray AA. Estrategia didáctica para la práctica de laboratorio de microbiología. Nayarit: UTP editorial; 2017.
81. Vázquez C, Martín A, Silóniz MI, Serrano S. Técnicas básicas de microbiología: Observación de bacterias. Reduca [Internet]. 2011 [citado el 13 de mayo del 2019]; 3(5): 15-38. Disponible en: <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/819>
82. Olivas E, Alarcón LR. Manual de Prácticas de microbiología básica y microbiología de los alimentos. Ciudad Juárez: UACJ; 2004.
83. Reynoso M, Magnoli C, Barros G, Demo M. Manual de microbiología general. Río Cuarto: UniRío; 2015.
84. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Manual de Laboratorio Microbiología General I. México: UNAM; 2017.
85. Sanz SA. Prácticas de microbiología. 2ª ed. La Rioja: Universidad de la Rioja; 2011.
86. Silverio CC. Microbiología general para investigaciones de laboratorio. Ecuador: UTMACH; 2015.
87. Montoya OI. Manual de microbiología. Medellín: Universidad Nacional de Colombia; 1999.



88. Rojas A. Conceptos y práctica de microbiología general. Palmira: Universidad Nacional de Colombia; 2011.
89. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Protocolo de prácticas: microbiología experimental. México: UNAM; 2014.
90. Castañeda MT. Microbiología aplicada: manual de laboratorio. México: UAM; 2009.
91. García MJ, Silva MC. Técnico especialista en laboratorio. Sevilla: editorial MAD; 2006.
92. Velarde FA., Rodríguez G. Manual para el análisis de líquidos corporales LCR, sinovial, ascítico, pleural, pericárdico [Internet]. 2015 [citado 23 de julio de 2019]. Disponible en: http://www.hcg.udg.mx/PAGs/Sec_Transparencia/PDFs_Transparencia/4E_64.pdf
93. Coli.usal. Análisis microbiológico de una muestra de orina [Internet] [citado el 23 de julio de 2019]. Disponible en: <http://coli.usal.es/web/abydl/orinas/urocultivo.pdf>
94. Burillo A., Moreno A., Salas C. Procedimientos en Microbiología Clínica [Internet]. 2006 [citado el 23 de julio de 2019]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia22.pdf>
95. Rezusta A., Sánchez A., Gil Joaquina. Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico [Internet]. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología; 2007 [citado el 24 de julio del 2019]. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo3.pdf>
96. Castro A, Guerrero OM. Técnicas de diagnóstico parasitológico. 2ª ed. Costa Rica: Editorial UCR; 2006.



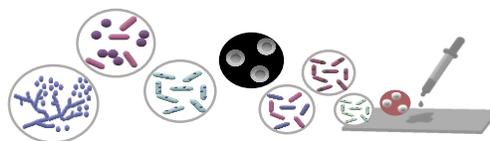
12. Anexos

Anexo 1.

Cuadro comparativo de documentos similares al libro "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología: un enfoque gráfico"

		Silverio CC. "Microbiología general para investigaciones de laboratorio"	UAA. "Manual de prácticas de la materia de enfermedades bacterianas de los animales domésticos"	Orozco MG, Murray RM, et al. "Estrategia didáctica para la práctica de laboratorio de microbiología"	Vázquez C, Silóniz MI. "Técnicas básicas de microbiología. Observación de bacterias"	Reynoso M, Magnoli C, Barros G, Demo M. "Manual de microbiología general"
	Medidas de bioseguridad	Aplica	Aplica	Aplica	No aplica	Aplica
	Manejo de RPBI	No aplica	No aplica	Aplica	No aplica	Aplica
Indicaciones y precauciones	Descripción escrita	Aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Aplica ¹
	Fotografías correspondientes	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
Tinción -Parte teórica-	Fundamento	Aplica	No aplica	Aplica	Aplica	Aplica
	Esquemas de la técnica de tinción	Aplica ¹	Aplica ¹	Aplica ¹	Aplica ¹	Aplica ³
	Cuadros comparativos de tiempos y técnica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
Ti nc	Sustento bibliográfico	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica

Continúa en la siguiente página



	Listado	Material	Aplica ²	Aplica ²	Aplica ¹	Aplica ²	No aplica
		Aparatos y equipo	No aplica	No aplica	Aplica ¹	No aplica	No aplica
		Reactivos	Aplica	Aplica ²	Aplica	Aplica ²	No aplica
		Cepas	Aplica	No aplica	Aplica	Aplica ²	No aplica
	Uso de cepas ATCC	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
	Fotografías	Material	No aplica				
		Aparatos y equipo	No aplica				
		Reactivos	Aplica ¹	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
		Cepas	No aplica				
	Numeración de los pasos	Aplica	Aplica	Aplica ¹	No aplica	Aplica	
	División por etapas	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
	Fotografías del procedimiento	Aplica ¹	No aplica	No aplica	Aplica ¹	No aplica	
	Tinción-Observación al microscopio-	Fotografías de las preparaciones	No aplica	Aplica ¹	Aplica	Aplica	Aplica ¹
		Descripción y/o interpretación esquemática	Aplica ¹	Aplica ¹	Aplica	Aplica ¹	Aplica
"Notas" aclaratorias		No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
RPBI generado-	Descripción escrita	Aplica ⁴	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
	Fotografías correspondientes	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
Uso de las etapas pre-analítica, analítica y post-analítica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica		
Bibliografía consultada	Aplica	Aplica	Aplica	Aplica	Aplica		

Continúa en la siguiente página



1. Aplica parcialmente: No está descrita o presente en todas las tinciones.
2. No hay una separación de los listados de material, reactivos, cepas y aparatos, según sea el caso.
3. Sólo muestra esquema de la etapa de preparación de la muestra.
4. Sin sustento normativo ni clasificación de residuos.
5. De forma no secuencial.
6. Sólo describe una breve introducción al tema.
7. De forma no secuencial.

		Rojas A. "Conceptos y práctica de microbiología general"	Sanz SA. "Prácticas de microbiología"	López LE, Hernández M, et al. "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología"	Castañeda MT "Microbiología aplicada. Manual de laboratorio"	UNAM, Facultad de Química. "Protocolo de prácticas. Microbiología Experimental"
Medidas de bioseguridad		Aplica	No aplica	No aplica	Aplica	Aplica
Manejo de RPBI		No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
Indicaciones y precauciones	Descripción escrita	Aplica	Aplica	No aplica	Aplica	Aplica
	Fotografías correspondientes	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
Tinción -Parte teórica-	Fundamento	Aplica	Aplica ¹	Aplica	Aplica	Aplica
	Esquemas de la técnica de tinción	Aplica	Aplica	Aplica ¹	Aplica ³	No aplica
	Cuadros comparativos	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica



	de tiempos y técnica						
Tinción -Procedimiento-	Sustento bibliográfico	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
	Listado	Material	Aplica ²	No aplica	No aplica	Aplica ²	Aplica ²
		Aparatos y equipo	Aplica ²	No aplica	No aplica	Aplica ²	Aplica ²
		Reactivos	Aplica ²	Aplica	No aplica	Aplica ²	Aplica ²
		Cepas	No aplica	No aplica	No aplica	Aplica ²	Aplica ²
	Uso de cepas ATCC	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
	Fotografías	Material	No aplica				
		Aparatos y equipo	No aplica				
		Reactivos	No aplica				
		Cepas	No aplica				
	Numeración de los pasos	Aplica	Aplica	Aplica ¹	Aplica	Aplica	
	División por etapas	Aplica	Aplica ⁵	No aplica	Aplica ⁵	Aplica	
	Fotografías del procedimiento	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
Tinción-Observación al microscopio-	Fotografías de las preparaciones	No aplica	No aplica	Aplica	No aplica	No aplica	
	Descripción y/o interpretación esquemática	Aplica	Aplica	Aplica	Aplica	No aplica	
	"Notas" aclaratorias	Aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
RPBI generado-	Descripción escrita	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Aplica ⁴	
	Fotografías correspondientes	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
Uso de las etapas pre-analítica, analítica y post-analítica		No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	

Continúa en la siguiente página



Bibliografía consultada	Aplica	Aplica	Aplica	Aplica	Aplica
-------------------------	--------	--------	--------	--------	--------

1. Aplica parcialmente: No está descrita o presente en todas las tinciones.
2. No hay una separación de los listados de material, reactivos, cepas y aparatos, según sea el caso.
3. Sólo muestra esquema de la etapa de preparación de la muestra.
4. Sin sustento normativo ni clasificación de residuos.
5. De forma no secuencial.
6. Sólo describe una breve introducción al tema.
7. De forma no secuencial.

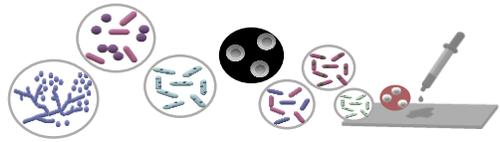
		UNAM, FES Zaragoza. "Manual de Laboratorio o Microbiología General I"	Olivas E, Alarcón LR. "Manual de Prácticas de microbiología básica y microbiología de los alimentos"	Montoya OI. "Manual de microbiología"	SGM. "Basic Practical Microbiology"	García A, Zamudio MM. "Manual de microbiología médica."
	Medidas de bioseguridad	Aplica	No aplica	No aplica	Aplica	No aplica
	Manejo de RPBI	Aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
Indicaciones y precauciones	Descripción escrita	Aplica	No aplica	Aplica	Aplica	No aplica
	Fotografías correspondientes	No aplica	No aplica	No aplica	Aplica ¹	No aplica
Tinción	Fundamento	No aplica ⁶	Aplica ¹	Aplica	No aplica	Aplica

Continúa en la siguiente página



	Esquemas de la técnica de tinción	Aplica	No aplica	Aplica	No aplica	No aplica	
	Cuadros comparativos de tiempos y técnica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
Tinción -Procedimiento-	Sustento bibliográfico	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
	Listado	Material	Aplica	No aplica	Aplica ²	No aplica	No aplica
		Aparatos y equipo	Aplica	No aplica	Aplica ²	No aplica	No aplica
		Reactivos	Aplica	No aplica	Aplica ²	Aplica	No aplica
		Cepas	Aplica	No aplica	Aplica ²	Aplica	No aplica
	Uso de cepas ATCC	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
	Fotografías	Material	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
		Aparatos y equipo	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
		Reactivos	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
		Cepas	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
	Numeración de los pasos	Aplica	Aplica	No aplica	Aplica	Aplica	
	División por etapas	Aplica ⁷	Aplica	Aplica ⁷	Aplica	No aplica	
	Fotografías del procedimiento	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
Tinción-Observación al microscopio-	Fotografías de las preparaciones	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
	Descripción y/o interpretación esquemática	No aplica	Aplica ¹	No aplica	Aplica ¹	Aplica	
	"Notas" aclaratorias	No aplica	No aplica	No aplica	Aplica	No aplica	
RPBI generado- Manejo-	Descripción escrita	Aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
	Fotografías correspondientes	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	
Uso de las etapas pre-analítica, analítica y post-analítica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	

Continúa en la siguiente página



Bibliografía consultada	Aplica	Aplica	Aplica	Aplica	Aplica
-------------------------	--------	--------	--------	--------	--------

- 1.-Aplica parcialmente: No está descrita o presente en todas las tinciones.
2. No hay una separación de los listados de material, reactivos, cepas y aparatos, según sea el caso.
3. Sólo muestra esquema de la etapa de preparación de la muestra.
4. Sin sustento normativo ni clasificación de residuos.
5. De forma no secuencial.
6. Sólo describe una breve introducción al tema.
7. De forma no secuencial.



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Química Farmacéutico Biológica



CUESTIONARIO PARA EVALUACIÓN DEL LIBRO LAS TINCCIONES BÁSICAS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA: UN ENFOQUE GRÁFICO

Introducción

Las técnicas de tinción son un elemento clave en el laboratorio para la detección de microorganismos en el análisis de muestras de interés clínico, pues además de ser el primer paso en el proceso de detección, su importancia se debe, además, a la información que aportan acerca de las características morfológicas, agrupación e inclusive, clasificación de los microorganismos.

Objetivo

Facilitar a los alumnos, profesores y personal afine al área de las ciencias Químico Biológicas, los procedimientos que se llevan a cabo para la realización adecuada de las técnicas básicas tinción, empleadas en el Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas de noveno semestre de la orientación Bioquímica Clínica de la carrera de Q.F.B, de la FES Zaragoza UNAM. Por lo anterior el presente cuestionario tiene como propósito evaluar la utilidad de dicho libro.

Instrucciones: Con base en la exposición realizada en el aula, contesta el siguiente cuestionario encerrando en un círculo la opción que te parezca más adecuada.

1. ¿Cómo consideras el contenido que presenta el libro?

- | | |
|--------------|------------|
| a) Excelente | c) Regular |
| b) Bueno | d) Malo |

2. ¿Cómo consideras la estructura que presenta el libro?

- | | |
|--------------|------------|
| a) Excelente | c) Regular |
| b) Buena | d) Mala |

3. ¿Cómo consideras las indicaciones y precauciones que presenta el libro?

- | | |
|---------------|--------------|
| a) Excelentes | c) Regulares |
| b) Buenas | d) Malas |

4. Los esquemas de las técnicas de tinción que presenta dicho libro son:

- | | |
|---------------|--------------|
| a) Excelentes | c) Regulares |
| b) Buenos | d) Malos |



5. ¿Cómo consideras la redacción presentada en las técnicas de tinción?

- a) Excelente
- b) Buena
- c) Regular
- d) Mala

6. Las imágenes presentadas en los procedimientos de las tinciones son:

- a) Excelentes
- b) Buenas
- c) Regulares
- d) Malas

7. ¿Cómo consideras los apartados que conforman los procedimientos de las tinciones?

- a) Excelente
- b) Bueno
- c) Regular
- d) Malo

8. ¿Cómo consideras los cuadros comparativos de los tiempos empleados por diferentes autores en las técnicas de tinción?

- a) Excelentes
- b) Buenos
- c) Regulares
- d) Malos

9. ¿Cómo consideras las imágenes de interpretación de los resultados y las preparaciones observadas al microscopio?

- a) Excelentes
- b) Buenas
- c) Regulares
- d) Malas

10. ¿Cómo considera la inclusión del manejo de RPBI que se generan en las técnicas de tinción incluidas en el libro?

- a) Excelente
- b) Buena
- c) Regular
- d) Mala

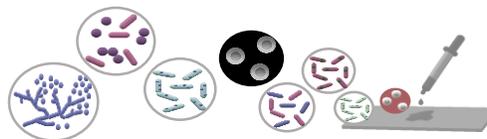
11. De manera general, este libro me parece:

- a) Excelente
- b) Bueno
- c) Regular
- d) Malo

12. De acuerdo a tus observaciones, ¿qué propondrías para mejorar el libro?

¡Muchas gracias por tu participación!





anaerobios en la muestra (sobre todo en muestras obtenidas de pacientes con infecciones intraabdominales o pulmonares), no debe quedar expuesta al oxígeno y debe procesarse en busca de anaerobios ⁽⁶⁰⁾.

Tomando en cuenta lo anterior, a continuación se explica el tratamiento más particular que se le debe dar a cada tipo de muestra:

Líquidos y materiales aspirados

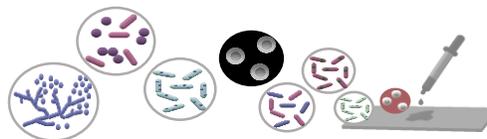
Las técnicas para el procesamiento en el laboratorio de todos los líquidos corporales estériles son similares salvo en casos donde se inocula directamente en frascos para hemocultivo. Los líquidos traslúcidos pueden concentrarse para centrifugación o filtración mientras que el material purulento puede sembrarse en forma directa en los medios de cultivo. Toda muestra de líquido corporal recibida en el laboratorio que se haya coagulado debe homogeneizarse para liberar las bacterias atrapadas y macerarse o cortarse para recuperar las células micóticas. El procesamiento de esas muestras en un homogeneizador de tejido mecánico o mediante la maceración manual del tejido permite un mayor aislamiento de bacterias. A menudo se prefiere la maceración manual, aunque esta puede lisar los elementos fúngicos: por consiguiente, no se la recomienda para las muestras en las que se buscan hongos. Cuando se buscan estos microorganismos se debe cortar todo el material con bisturí y, en condiciones asépticas, colocar cantidades pequeñas en forma directa en los medios de cultivo para hongos ⁽⁶⁰⁾.

Silos líquidos se concentraron por centrifugación, el sedimento resultante debe inocularse en un caldo nutritivo y en placas de agar sangre y agar chocolate. Como estas muestras provienen de sitios normalmente estériles, no se aconseja el empleo de medios de cultivo selectivos porque pueden inhibir el crecimiento de algunos de los microorganismos que se están buscando ⁽⁶⁰⁾.

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Se debe realizar primero un análisis macroscópico de la muestra, en donde se incluyan observaciones como la claridad, el color, sobrenadante y formación de coágulo. Hay que tomar en cuenta que el aumento del recuento celular causa turbidez ⁽⁹²⁾.

Antes de cualquier cosa, es importante mencionar que para ésta muestra biológica y las demás, los valores de referencia pueden variar ligeramente dependiendo de los parámetros establecidos en cada laboratorio, por lo tanto no se colocan en este trabajo, además de estar fuera de los objetivos planteados ⁽⁹²⁾.



Posteriormente, se procede a realizar el análisis microscópico, para lo cual la muestra debe mezclarse bien antes. Se cuentan las células empleando la cámara hemocitométrica, para el recuento de células. En dado caso que el número de células sea demasiado elevado se debe proceder a diluir la muestra ⁽⁹²⁾.

Dentro de los aspectos a analizar para este tipo de muestra destaca el análisis cuantitativo de proteínas totales, albúmina y concentración de glucosa ⁽⁹²⁾.

Por otra parte, se debe realizar la tinción de Gram, Ziehl Neelsen y tinta china ⁽⁹²⁾.

Orina

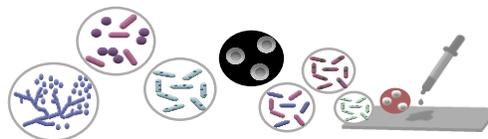
Para un análisis de orina completo deben realizarse los aspectos químico, macroscópico y microscópico. Dentro de los primeros entra el análisis de UREA, creatinina, leucocitos, glucosa, proteínas, entre otros. Dentro del aspecto macroscópico se engloba el volumen, aspecto, color, turbidez, etc. Por otra parte, dentro del análisis microscópico se estudian los cristales, hematíes, leucocitos, bacterias, etc ⁽¹³⁾.

Con la previa obtención de la muestra, si no puede cultivarse inmediatamente, debe ser refrigerada. Una vez que se haya recibido la muestra en el laboratorio, se inocula de 1-10 μL en cada medio de cultivo (un medio de agar selectivo y un medio de agar no selectivo). Se hace para que se pueda cuantificar el número de microorganismos presentes en la orina, lo cual es de utilidad para valorar la significación de una cepa ⁽¹³⁾.

Si se requiere se puede realizar un análisis microbiológico, es decir un microcultivo, el cual a su vez irá acompañado de una tinciones para la identificación de bacterias, como puede ser la tinción de Gram. Para lograr esto último se debe hacer dicha tinción a partir de una colonia crecida de agar CLED. Si se trata de una levadura se prefiere que se siembre en agar Saboureaud para aislar y si se trata de un bacilo Gram negativo se prefiere que se siembre en agar MacConkey y nutritivo para el aislamiento. Si se trata de un coco positivo se debe sembrar en agar nutritivo y en agar sal y manitol. Posteriormente se deben realizar las pruebas bioquímicas para la identificación de las bacterias ⁽⁹³⁾.

Tejido sólido

Se deben tomar en cuenta las siguientes indicaciones generales para cualquier tipo de muestra de tejido sólido:



- Pretratamiento de las muestras:

Las muestras de gran tamaño no precisan trituración, se debe fraccionar la muestra con bisturí y realizar una impronta con el borde de la muestra recién cortado en los medios y posteriormente la extensión sobre porta. Las muestras muy pequeñas pueden inocularse directamente en el caldo de enriquecimiento ⁽⁹⁴⁾.

Las muestras de tejidos duros o adheridos a tejidos duros plantean más dificultades. Siempre que la muestra lo permita se procede a la homogenización o a la extracción de pequeños fragmentos de muestra, procesándose seguidamente como se ha descrito. En el caso de fragmentos óseos se inoculan directamente en caldo de enriquecimiento. Si hay fragmentos de tejidos blandos se procede a separarlos del tejido duro y procesarlos, de forma paralela, como otra muestra. La impronta para la extensión sobre porta de este tipo de muestras presenta ciertas dificultades, es recomendable incluir la muestra entre dos portas presionando y desplazando ambos entre sí hasta conseguir una extensión fina ⁽⁹⁴⁾.

Siempre que las condiciones de trabajo lo permitan las muestras se conservarán refrigeradas durante 7 días por si son necesarios estudios complementarios ⁽⁹⁴⁾.

Líquido pleural

Se debe analizar su aspecto macroscópico, en donde la turbidez se asocia al grado de contenido celular o de triglicéridos. El examen del sobrenadante tras la centrifugación permite su diferenciación. Podría presentarse también hemático (rojizo) ⁽⁹²⁾.

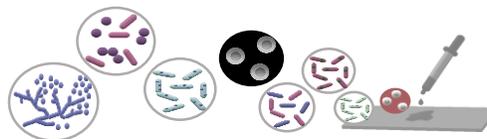
Por otra parte se debe realizar el conteo de leucocitos y eritrocitos, así como de neutrófilos y eosinófilos ⁽⁹²⁾.

Dentro del estudio bioquímico se valora el pH, proteínas, glucosa, urea, amilasa, LDH y colesterol ⁽⁹²⁾.

Líquido ascítico

Dentro de los aspectos macroscópicos se evalúa la turbidez. Un aspecto turbio o purulento indica la presencia de abundantes leucocitos. Una elevada concentración de triglicéridos da al líquido un aspecto opalescente-lechoso. Si existen muchos hematíes se verá con una coloración rojiza ⁽⁹²⁾.

Dentro del aspecto microscópico se evalúan leucocitos, eritrocitos, células mesoteliales y neutrófilos ⁽⁹²⁾.



Dentro el aspecto bioquímico se evalúa las proteínas y enzimas como la colinesterasa, el lactato-deshidrogenasa, la fosfatasa alcalina, amilasa y lipasa ⁽⁹²⁾.

Líquido sinovial

El análisis del líquido sinovial debe comenzar en el mismo momento de la toma de muestra, ya que su observación macroscópica puede aportar información muy valiosa para determinar si puede clasificarse como no inflamatorio, inflamatorio, infeccioso y/o hemorrágico ⁽⁹²⁾.

Un líquido no patológico debe observarse incoloro y transparente, pues la presencia de turbidez se asocia a un incremento de celularidad, etc ⁽⁹²⁾.

El estudio microscópico es fundamental junto con el análisis microbiológico. Este deberá incluir un recuento celular total y diferencial, así como la presencia o no de cristales. El recuento celular total forma la parte más importante del examen citológico, pues refleja el grado de inflamación articular. Se debe realizar lo antes posible tras su extracción para evitar la degeneración celular. El recuento se hace en cámara de recuento con el aumento de 40X. El frotis se debe teñir con Papanicolaou y ofrece una muy buena observación de la morfología celular ⁽⁹²⁾.

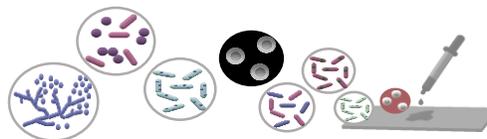
El recuento diferencial usa la tinción de May Grunwald-Giemsa. En el líquido sinovial se observan los mismos elementos celulares que en la sangre pero en diferentes proporciones y con morfología variable en función de la intensidad de la respuesta inflamatoria articular ⁽⁹²⁾.

La observación de cristales es importante, aunque su identificación no es fácil, pues requiere de un equipamiento adecuado. Dicho análisis debe realizarse en una muestra fresca que mantenga la integridad celular. Es necesario el uso de microscopio de luz polarizada ⁽⁹²⁾.

Dentro de los demás parámetros a determinar para esta muestra biológica se encuentra la glucosa, proteínas y el lactato ⁽⁹²⁾.

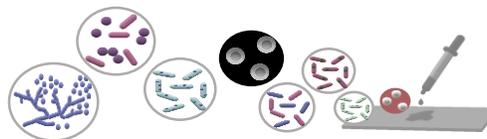
Muestras micológicas

Para el tratamiento de estas muestras dependerá en gran parte su origen, es decir, si el hongo se encuentra en pelo, piel, etc., pero de manera general se deben seguir las siguientes indicaciones para la preparación de muestras micológicas ⁽⁹⁵⁾:



- Para optimizar tanto la observación microscópica como el cultivo, es necesario preparar la muestra, aunque algunas se pueden inocular directamente sin que sea necesaria su manipulación previa.
- Todas las muestras deben observarse macroscópicamente y seleccionar la parte más representativa.
- En muestras como esputo y tejidos deben buscarse las zonas de pus, caseificación, o necrosis.
- Los tejidos deben ser troceados e inoculados en pequeños trozos en el medio de cultivo con el fin de facilitar el crecimiento o la penetración de algunos colorantes como el blanco de calcoflúor.
- La utilización de homogenizadores no está completamente aceptada ya que puede destruir a los hongos no septados.
- El troceado puede realizarse con tijeras o bisturí, el proceso puede realizarse en una placa de petri añadiendo unas gotas de agua destilada estéril.
- Las muestras altamente viscosas, como el esputo, deben fluidificarse, sin diluirlas excesivamente. Y si son muy diluidas deben concentrarse mediante centrifugación. Este proceso es especialmente útil para *Pneumocystis jiroveci*.
- Los líquidos orgánicos (LCR, pleural, peritoneal, articular, etc.) deben concentrarse por centrifugación (1500-2500 g durante 10 min) o filtración (0,2 μm de poro), siempre que haya suficiente cantidad. Estas muestras pueden requerir un procesamiento especial o ser sembradas directamente en el medio de cultivo.
- Los fragmentos ungueales se trocean progresivamente con un bisturí y se pulverizan.

El diagnóstico definitivo de la mayoría de las micosis requiere el aislamiento e identificación del hongo a partir del cultivo, lo que supone, con frecuencia, varios días o semanas de dilación. No obstante, el método más rápido para la detección de estructuras fúngicas en una muestra clínica es el examen microscópico de la misma. Este examen puede aportar, en ocasiones, un diagnóstico definitivo (pitiriasis versicolor) y en otras, un diagnóstico de sospecha previo a la confirmación definitiva por cultivo. Por lo tanto, es un procedimiento que debería ser realizado en todos los laboratorios ya que puede realizarse mediante técnicas sencillas, aunque a veces puede requerir tinciones complejas, permitiendo dirigir los medios adecuados para el cultivo de la muestra. Sin embargo, si la muestra es escasa, el cultivo debe ser prioritario. Las técnicas moleculares comienzan a ser una realidad



y permitirán un diagnóstico más rápido que el cultivo, si bien están menos desarrolladas que para las bacterias o los virus ⁽⁹⁵⁾.

Escamas. Las escamas se colocan dentro de una caja de Petri o entre dos portaobjetos estériles o flameados, y se cubren con una hoja de papel donde pueden anotarse los datos. En lesiones húmedas es mejor utilizar cucharilla, pinzas o tijeras. También es muy eficaz el uso de hisopos previamente humedecidos en agua estéril, con los cuales se raspa la lesión y luego se pasan sobre la superficie del medio de cultivo. La cinta adhesiva transparente (Scotch tape) se emplea en pitiriasis versicolor y dermatitis seborreica; se aplica la cinta sobre la piel enferma y luego sobre un portaobjetos (al cual previamente se le coloca una gota de algún colorante como, por ejemplo, tinta Parker o negro de clorazol) para observación directa al microscopio ⁽⁵⁶⁾.

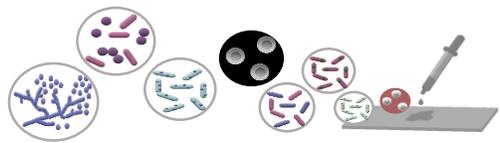
Pus y líquidos patológicos (líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, orina). Se deben obtener las muestras con técnica estéril y sembrar una cantidad suficiente (0.5 ml); en abscesos, si es posible, se punciona y aspira con una jeringa; se levantan las costras y se deposita la muestra en tubos estériles. En líquido cefalorraquídeo (LCR) y orina, conviene centrifugar la muestra a 2000 revoluciones por minuto (rpm) por 20 min; luego, con una pipeta de Pasteur estéril, se separa con sumo cuidado el sobrenadante y se pasa a un tubo estéril; el sedimento se utiliza para las pruebas diagnósticas. En LCR, se usa tinta china para detectar *Cryptococcus* ⁽⁵⁶⁾.

Heces. Se recolectan en un recipiente estéril. Para detectar la presencia de *Candida* o *Geotrichum* quizá baste un pequeño volumen obtenido con un hisopo rectal. En un portaobjetos, se dilacera un volumen reducido sobre una gota de agua estéril o lactofenol y se coloca el cubreobjetos ⁽⁵⁶⁾.

Sangre

A una muestra de sangre se le pueden realizar diversos tipos de análisis, sin embargo, en ésta área nuestro principal interés es la tinción de Wright ⁽⁹⁶⁾.

Para realizar una tinción de Wright, se sugiere realizar lo siguiente, sin embargo, se debe tomar en cuenta que los tiempos variarán dependiendo de cada laboratorio, pues ésta técnica no forma parte de las realizadas por los autores en este trabajo. La referencia de dónde se obtuvo se muestra al final. El procedimiento es el siguiente ⁽⁹⁶⁾:



1. Cubrir la preparación con el colorante de Wright de 2 a 4 min.
2. Agregar sobre el colorante (sin eliminarlo) la solución buffer pH 6.8 y dejarlo de 4 a 8 min.
3. Lavar con agua y secar al aire.

Otra de las pruebas que se pueden realizar es el hemocultivo. El éxito del hemocultivo se relaciona directamente con los métodos utilizados para recoger la muestra de sangre. El factor más importante de esta prueba es el volumen de sangre procesada, por ello se deben recoger aproximadamente 20 mL de sangre de un adulto por cada frasco de hemocultivo, y se deben recoger volúmenes proporcionalmente más pequeños de niños y de neonatos, también es importante realizar una desinfección cuidadosa de la piel del paciente.

La mayoría de las muestras de sangre se inoculan directamente en frascos que contienen caldos enriquecidos. Para asegurarse la máxima recuperación de microorganismos importantes, se debe inocular dos frascos de medios para cada cultivo (10 mL de sangre por frasco). Dado que por lo general hay escasos microorganismos en la sangre de un paciente séptico, no merece la pena realizar una tinción de Gram de la sangre para un análisis microscópico ⁽¹³⁾.