

TRABAJO PRÁCTICO N°2

Tinciones y morfología bacteriana

Introducción:

En la microbiología, el microscopio se utiliza de forma rutinaria, ya que proporciona información importante para la identificación temprana y definitiva de los microorganismos. Por su parte, las tinciones en esta área son las primeras herramientas que se utilizan en el laboratorio para el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Aunque los microorganismos vivos se pueden observar directamente en fresco al microscopio óptico, la mayoría de las veces es necesario teñirlos para que, por medio del uso de colorantes, sea más sencilla su identificación y, además, la presencia de ciertas estructuras o reacciones a determinadas técnicas permita identificar y clasificar a las bacterias. En este sentido entonces, los colorantes poseen las siguientes funciones:

1. Hacer visibles objetos microscópicos y transparentes
2. Revelar su forma y tamaño
3. Mostrar la presencia de estructuras internas y externas
4. Producir reacciones químicas específicas

Un colorante se define como una sustancia capaz de dar color a células, tejidos, fibras, entre otros. De acuerdo con su origen, los colorantes se pueden dividir en:

- Colorantes naturales: extraídos de plantas o animales
- Colorantes artificiales: son aquellos de minerales procesados y manipulados en laboratorio

Por su parte, las tinciones o coloraciones se pueden clasificar como:

- Simples: cuando toda la muestra se tiñe del mismo color y se utiliza un único colorante.
- Diferenciales: cuando se visualiza más de un color porque se utiliza más de un colorante.
- Específicas: cuando se utiliza anticuerpos marcados con una molécula fluorescente para identificar estructura celular en particular.

Algunas técnicas, requieren previo a la tinción, un proceso de fijación de la muestra. Esta fijación se puede realizar de manera química o física. Entre los procesos de fijación física podemos destacar la desecación, el calor seco, calor húmedo, ultrasonido y microondas. Por su parte, como fijadores químicos encontramos a los oxidantes (óxido crómico, ácido acético, ácido pícrico, acetona, dicromato de potasio) y los reductores (formaldehído, glutaraldehído, etanol, metanol, paraldehído).

Dentro de las tinciones más clásicas para diferenciar grupos bacterianos, encontramos a la tinción de Gram. esta tinción se define como diferencial, ya que utiliza dos colorantes, y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas. Fue desarrollada en 1884 por el científico danés Hans Christian Gram y hoy en día sigue siendo una de las tinciones más utilizadas universalmente debido a lo económico, sencillo y eficaz que resulta. Los principios de la tinción de gran se basan en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades

determinantes a cada microorganismo. La pared celular de Gram-negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram-positivas poseen una pared celular gruesa, constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa; así pues, la composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared celular de estas Gram-positivos y Gram-negativos, explica y determina sus características tintoriales (Figura 1).

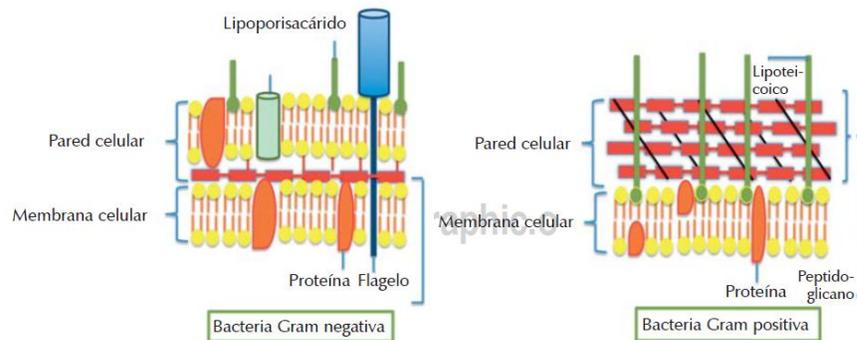


Figura 1: Representación de las características de la pared celular de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

La tinción de Giemsa, desarrollada por el alemán Gustav Giemsa, es un método habitual para el examen de frotis sanguíneos, cortes histológicos y otro tipo de muestras biológicas. Este método tiene utilidad, principalmente para poner de manifiesto *Rickettsias* localizadas dentro de las células hospedadoras. También se puede utilizar para teñir frotis de sangre en el examen de protozoos. Este método de tinción a su vez permite diferenciar zonas con un elevado contenido de ADN, por lo que se puede utilizar para distinguir en el microscopio óptico el núcleo celular, los cromosomas durante la mitosis, entre otros.

La técnica de Giemsa está formada por varios colorantes: los tintes neutros utilizados combinan el azul de metileno, Azure A y Azure B como tintes básicos, y la eosina como tinte ácido, dando así una amplia gama de colores.

Objetivos:

- ✓ Entender el concepto de coloración diferencial en diferentes preparados
- ✓ Poner en práctica la tinción de Gram y la tinción de Giemsa
- ✓ Clasificar bacterias en Gram-positivas y Gram-negativas
- ✓ Identificar estructura, morfología y agrupación de bacterias
- ✓ Analizar frotis sanguíneos por tinción con Giemsa
- ✓ Entender le utilidad de las coloraciones para diagnóstico clínico veterinario

Técnica operatoria:

Tinción de Gram

En el práctico los alumnos se dividirán en diferentes grupos, a cada uno de los cuales los docentes entregarán cultivos en medio sólido de diferentes aislamientos bacterianos. Con estos cultivos deberán

Facultad de Ciencias Agropecuarias – Universidad Católica de Santa Fe

Carrera: Veterinaria

Materia: Microbiología

realizar los preparados en portaobjetos siguiendo las indicaciones de los docentes. Las muestras deberán secarlas y fijarlas por calor seco en mechero. Posteriormente se seguirán los pasos para realizar la tinción.

1. En la bandeja para tinción colocar los portaobjetos fijados
2. Cubrir la muestra con cristal violeta (1 min)
3. Enjuagar con agua destilada
4. Cubrir la muestra con Lugol (1 min)
5. Enjuagar con agua destilada
6. Cubrir con alcohol-acetona (30 segundos)
7. Enjuagar con agua destilada
8. Cubrir la muestra con safranina (1 min)
9. Enjuagar con agua destilada
10. Dejar secar al aire. Observar al microscopio

En todos los pasos ser sumamente cuidadosos con la manipulación de los colorantes y todos los objetos utilizados en la tinción porque manchan las superficies.

Tinción de Giemsa

Para este caso, se entregarán portaobjetos con frotis de sangre realizados en ellos. Se realizará la fijación química utilizando metanol. Para ello se cubre la muestra con metanol puro y se deja durante 3 minutos. Posteriormente se enjuaga con agua destilada. Se cubre la muestra con colorante de Giemsa (diluido al 10% v/v en PBS) y se deja actuar por 30 minutos. Se enjuaga con agua destilada, se deja secar al aire y se observa en microscopio.