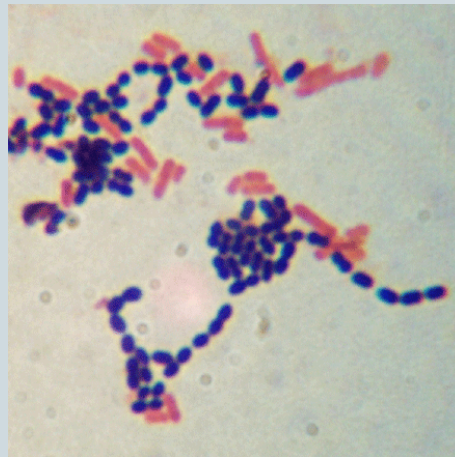


Tinciones



OBJETIVOS

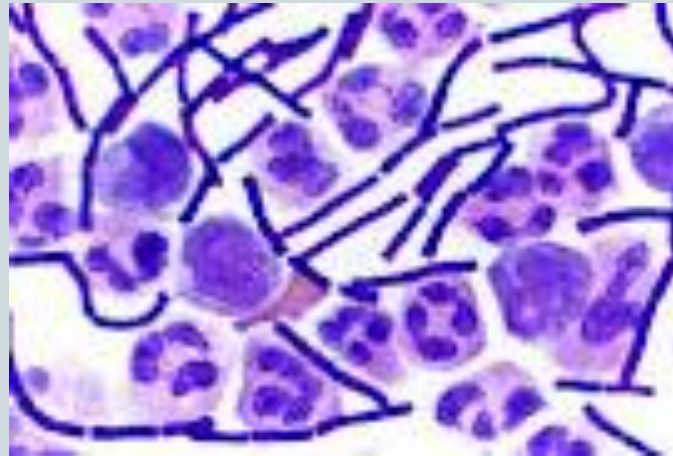


- Estudiar las bases teóricas y químicas de una tinción biológica
- Realizar la preparación de un frotis
- Hacer una tinción simple
- Efectuar una tinción diferencial (Tinción Gram)
- Estudia la teoría de tinción de endospora, de cápsula y de organismos ácido resistente.

Importancia



- Una de las técnicas más utilizadas en los laboratorios para clasificar microorganismos.



Desventajas de las tinciones



- Requiere fijar la muestra con calor
- Calor y químicos pueden distorcionar la forma original de la célula

Tinciones



- **Tinte = cromógeno + auxócromo**
- **Cromógeno**= Benceno (solvente orgánico) + cromóforo (grupo que provee las propiedades de color)
- **Auxócromo**- grupo químico que se ioniza con el cromógeno y forma sales que se pegan a las fibras y tejidos.

Tipos de Tintes



- **Básicos**- Tienen carga catiónica. La porción del cromógeno tiene carga positiva y poseen gran afinidad por los componentes celulares negativos.
- Estos tintes son los más utilizados debido a que las bacterias tienen una superficie con carga negativa.
- Ejemplos: Azul de metileno, cristal violeta y carbolfucsina

Tipos de Tintes



- **Acídicos-** Tienen **carga aniónica**. La porción del cromógeno es negativa y tienen gran afinidad por los componentes celulares positivos.
- Las sales de sodio, potasio, calcio o amoniacó de ácidos con color son ionizados para producir un cromógeno con carga negativa.
- Ej. safranina

Tinción simple



- Utilizado para observar el tamaño, arreglo y forma.
- Se utiliza un solo tinte.
- **Tinción directa**- se tiñe a la bacteria.
- **Tinción negativa**- tiñe el fondo pero no a la bacteria

Tinción diferencial



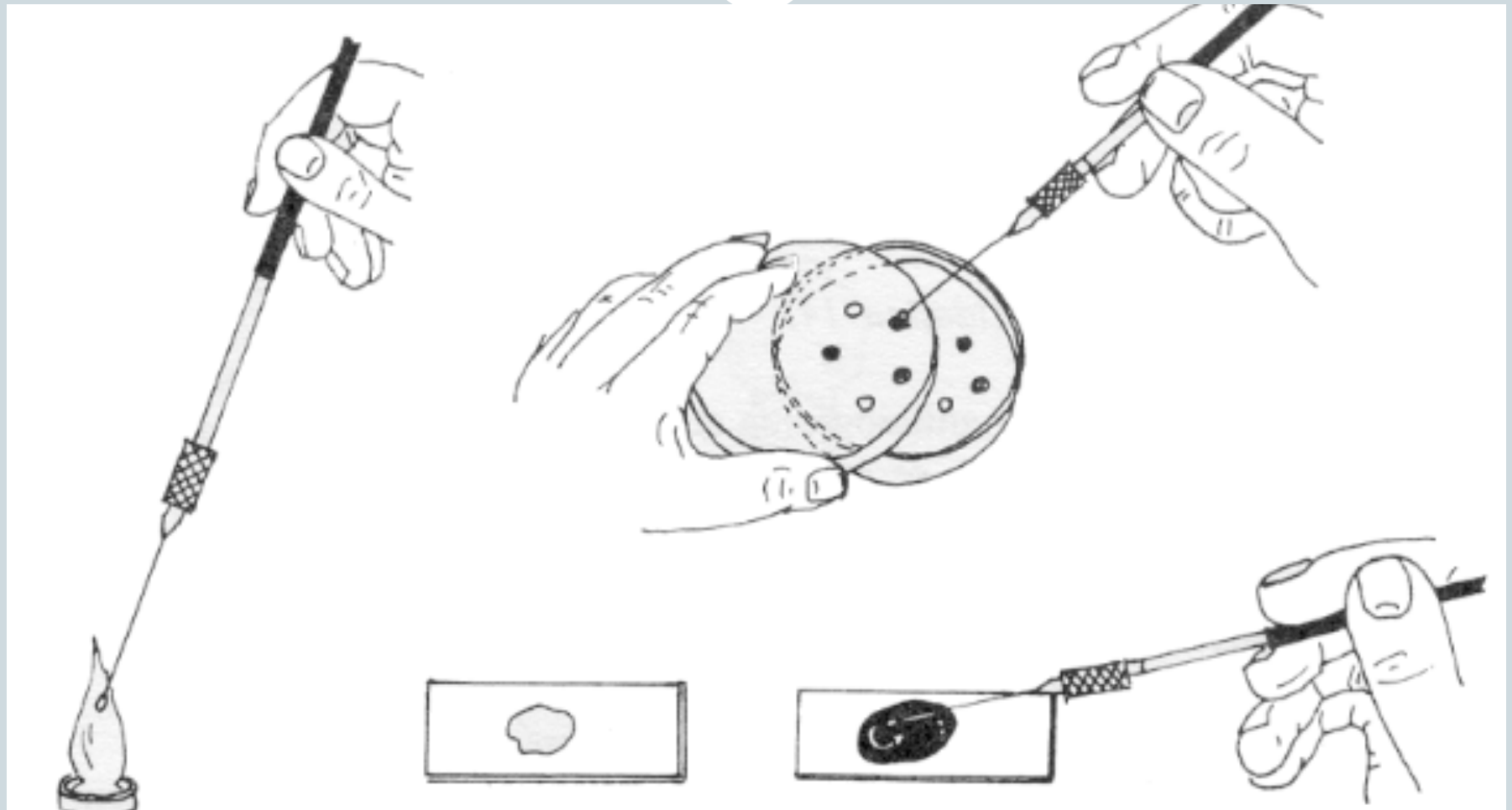
- Es una gran herramienta para separar y clasificar los microorganismos observados de acuerdo a sus características.
- Es mayormente utilizada para visualizar las estructuras como los flagelos, cápsulas y esporas.
- Para ser clasificado como tinción diferencial debe tener al menos tres tintes
- **Ejemplo- Tinción Gram**

Tinción GRAM



- **Tinte primario-** cristal violeta, tiñe la bacteria de color violeta
- **Agente mordante-** Yodo- forma un complejo insoluble con cristal violeta. Ayuda a adherir el tinte a la célula. Ayuda a resistir la decoloración
- **Agente decolorizante-** alcohol etílico al 95%, el cual sirve como solvente de lípidos y agente deshidratante de proteínas.
- **Contratinte-**safranina-tiñe de rojo a la bacteria

Frotis



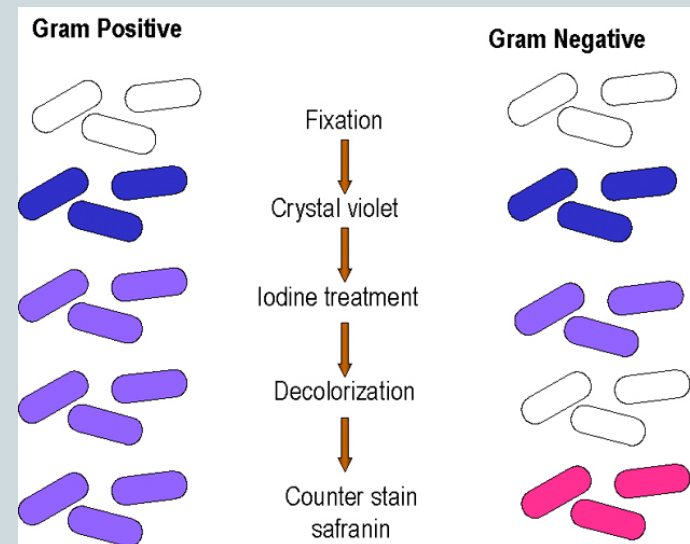
Preparación del frotis

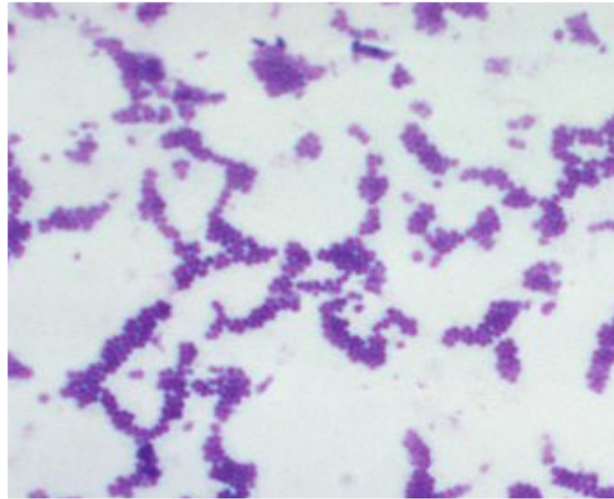


- Limpiar la laminilla con papel de lentes.
- Prepara el frotis
- **Medio líquido**- solo se coloca una porción del cultivo con el “loop” en la laminilla. (Agitar)
- **Medio sólido**- se coloca una **gotita** de agua destilada en la laminilla y se diluye la porción de cultivo en ella. **Se esparce bien.**
- Secar a temperatura ambiente
- Fijación por calor

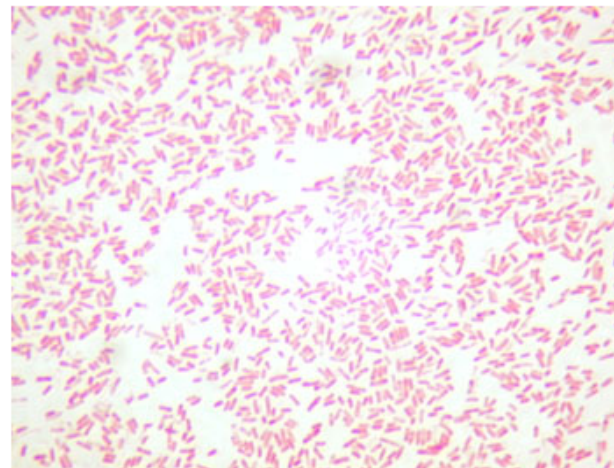
Preparación de la tinción Gram

- Preparación del frotis
- Cristal violeta (30 segundos - 1minuto)
- Lavar con agua
- Yodo (1 minuto)
- Lavar con agua
- Alcohol etílico al 95% suavemente
- Lavar con agua
- Safranina (45 segundos)
- Lavar con agua
- Secar con “bibulous paper”



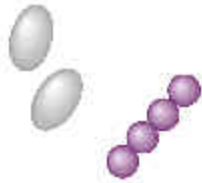


Bacterias Gram positivas



Bacterias Gram negativas

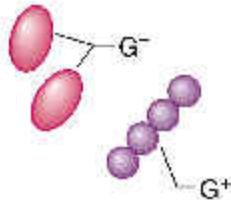
Step 3



Decolorize with alcohol briefly — about 20 sec

Gram-positive cells are purple; gram-negative cells are colorless

Step 4



Counterstain with safranin for 1–2 min

Gram-positive (G^+) cells are purple; gram-negative (G^-) cells are pink to red

- **Membrana Gram (-)**
 - Soluble a ROH
 - Capa de peptidoglicano fina para retener complejo cristal violeta/yodo
- **Membrana Gram (+)**
 - Se deshidratan los poros y se cierran
 - Se retiene complejo cristal violeta/yodo por consiguiente el color.

Tinción Acido-Resistente



- Las familias **Mycobacteriae** y **Nocardiaceae** son ácido resistente.
- Los microorganismos ácido-resistentes se caracterizan por tener una pared celular gruesa de cera (lipoidal) que contiene ácido micólico.
- Los organismos que son decolorizados por el alcohol ácido no son ácido resistente.



- **Tinte primario**- Carbofucsina-tinte rojo fenólico (5%). Puede penetrar la pared
- **Agente decolorizante**- alcohol ácido (3% HCl +95% alcohol etílico)
- **Contratinte**-Azul de metileno- se utiliza para teñir de azul las bacterias que quedaron incoloras

Procedimiento:

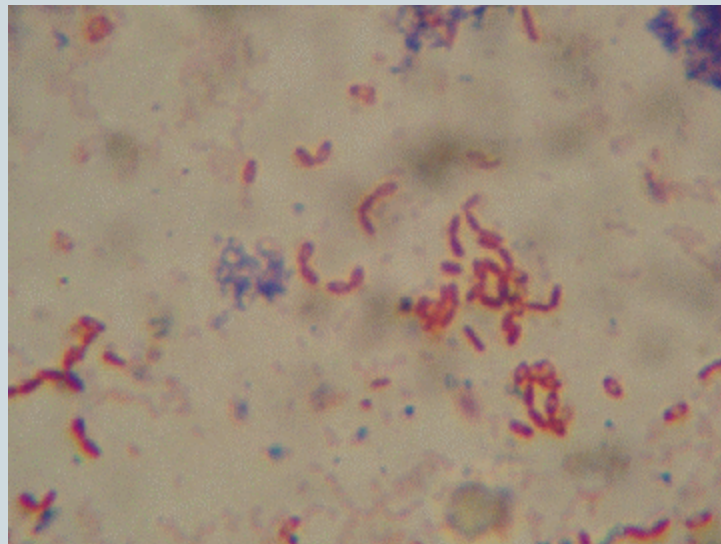


- Preparar un frotis
- Carbolfucsina (3 minutos) Utilizar un papel toalla bien impregnado del reactivo.
- Lavar con agua
- Decolorizar con alcohol etílico
- Lavar con agua
- Azul de metileno por 2 minutos
- Lavar con agua
- Secar con “bibolous paper”

Esporas



- Condiciones ambientales hostiles, ocurre esporogénesis la cual forma la espora Condiciones ambientales favorables, ocurre germinación, lo cual forma la célula vegetativa



Tinción de esporas

Método de Schaffer-Fulton

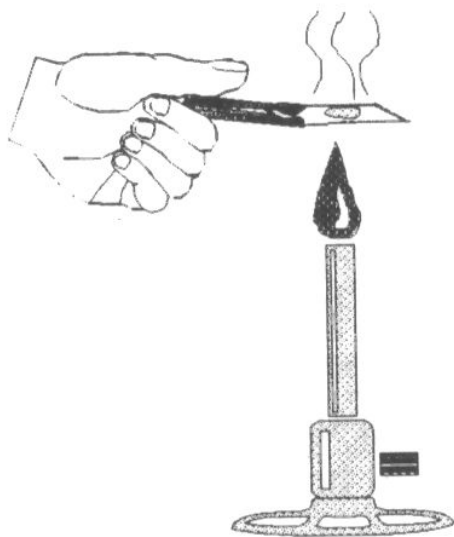


- **Célula vegetativa**- forma metabólicamente activa = bacterias
- **Esporas**- forma metabólicamente inactiva y altamente resistente
- Los miembros del género anaerobio *Clostridium*, *Desulfotomaculum* y *Bacillus* pueden existir metabólicamente activos o inactivos.

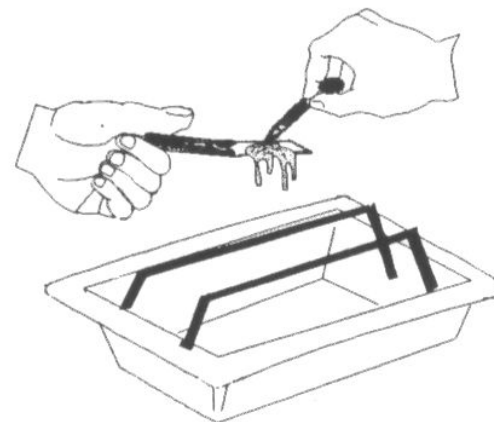


- **Tinte primario-Verde Malaquita-** Requiere calor para la penetración de este tinte.
- **Agente decolorizante- Agua-** remueve el exceso de tinte, decoloriza la célula vegetativa
- **Contratinte-Safranina-** Tiñe las células vegetativas

Procedimiento



2. CALENTAR (5 min)



5. LAVAR



- Preparar el frotis
- Verde Malaquita (2-3 minutos) en calor
- Dejar enfriar la laminilla y enjuagar con agua
- Safranina (30 segundos)
- Lavar con agua
- Secar con “bibulous paper”

Tinción de cápsula



- Cápsula-estructura gelatinosa secretada por algunas bacterias
- Las células que tienen cápsula son virulentas y causan enfermedades ya que protegen a la célula de la acción fagocítica del hospedero.
- La mayoría de las cápsulas están compuestas de polisacáridos, por lo que son solubles en agua.

Tintes para tinción de cápsula



- **Tinte primario-** Cristal Violeta 1%- tiñe todo el frotis color oscuro
- **Decolorizante y Contratinte-** Sulfato de Cobre 20%-se usa para enjuagar el tinte primario
- No se enjuaga con agua por que la cápsula es soluble en agua.- función de decolorizante
- El CuSO_4 es absorbido en el material de la cápsula que ha sido decolorizada - función de contratinte

Procedimiento



- Preparación de un frotis cargado (“heavy”)
- •Dejar secar a temperatura ambiente
- •Cristal violeta 1% (5-7 minutos)
- •Enjuagar con CuSO_4
- •Secar con “bibulous paper”