

PRÁCTICA 2.2. Preparaciones Microbiológicas (2ª sesión)

2.2.5 Tinciones diferenciales

- a. Tinción de Gram
- b. Tinción de Ziehl Neelsen

Objetivos

Al finalizar esta práctica el alumno será capaz de:

- Identificar y describir las características microscópicas y tintoriales de las bacterias.

Introducción

La reacción a la tinción de Gram y de Ziehl-Neelsen se basa en la composición y estructura de la pared celular, que determina que unas bacterias retengan el primer colorante, en tanto que otras lo pierdan, lo que les permite reaccionar con el colorante de contraste.

Materiales

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

Cepas de referencia:

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Escherichia coli ATCC 25922

Cepas de prueba (X):

Bacillus sp

Klebsiella o *Serratia marcescens*

Moraxella sp

Mycobacterium sp.

Streptococcus oralis

Material por equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

Colorantes para tinción de Gram

Frascos gotero con fucsina fenicada, azul de metileno de Loeffler, alcohol ácido

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Portaobjetos

Cubreobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinciones

Pinzas

Piseta

Paño limpio de algodón

Papel seda

Frasco con una solución de sanitizante para desechar preparaciones

Metodología

Lavar y desengrasar los portaobjetos y cubreobjetos. Para ello emplear jabón líquido y agua; enjuagar varias veces con alcohol al 95%, ponerlos a secar y flamearlos 2 a 3 veces.

2.2.5 Tinciones diferenciales

Tinción de Gram

1. Etiquetar tres portaobjetos por uno de sus extremos con los nombres de: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y el tercero con la bacteria X.
2. Preparar los frotos bacterianos a partir de cultivos líquidos o sólidos.
3. Fijar con calor (mechero).
4. Agregar cristal violeta en cantidad suficiente para cubrir el frote (2 a 3 gotas) y dejar actuar 1 minuto.
5. Lavar con el mínimo de agua para eliminar el exceso de colorante.
6. Agregar lugol en cantidad suficiente para cubrir el frote (2 a 3 gotas) y dejar actuar 1 minuto.
7. Lavar con el mínimo de agua para eliminar el exceso de mordente.
8. Decolorar con alcohol acetona hasta que el efluente salga incoloro.
9. Lavar con agua para eliminar el exceso de disolvente.
10. Agregar safranina en cantidad suficiente hasta cubrir el frotis (2 ó 3 gotas) y dejar actuar 1 minuto.
11. Lavar con agua para eliminar el exceso del colorante de contraste.
12. Dejar secar la preparación a temperatura ambiente.
13. Observar al microscopio con los objetivos de 10x, 40x y 100x.
14. Esquematizar las observaciones realizadas con el objetivo de mayor aumento y describir las características de los microorganismos observados e indicar si son Gram positivos o Gram negativos (cuadro 2).

b) Tinción de Ziehl Neelsen

1. Etiquetar los portaobjetos por uno de sus extremos.
2. En el portaobjetos colocar 1 gota del cultivo de *Mycobacterium sp.* y 1 gota del cultivo de *Staphylococcus aureus*.
3. Con el asa mezclar las dos suspensiones.
4. Secar al aire y fijar con calor (mechero).
5. Cubrir la preparación con un papel filtro y saturarla con fucsina básica fenicada, calentar la preparación pasando la flama del mechero. Dejar actuar el colorante durante 10 minutos cuidando que no se seque la preparación.
6. Dejar enfriar la preparación.
7. Con unas pinzas largas retirar el papel filtro y colocarlo en un frasco para su posterior desecho
8. Lavar con abundante agua (hasta que el efluente salga incoloro).
9. Decolorar con alcohol ácido el que se agrega gota a gota hasta que el efluente salga incoloro.
10. Lavar la preparación.
11. Cubrir la preparación con 2 a 3 gotas de azul de metileno de Loeffler y dejar actuar 2 minutos.
12. Lavar el exceso de colorante con el mínimo de agua.
13. Secar a temperatura ambiente.

14. Observar al microscopio con el objetivo de 100x.
15. Esquematizar sus observaciones y describir las características de los microorganismos e indicar si son Bacterias Ácido Alcohol Resistentes (BAAR) o bacterias No Ácido Alcohol Resistentes (cuadro 2)

Cuadro 2. Características microscópicas de bacterias, de acuerdo a la tinción de Gram y de Ziehl-Neelsen.

| Microorganismo | Forma ¹ | Agrupación ² | Gram / Ácido resistencia ³ | Esquema |
|----------------|--------------------|-------------------------|---------------------------------------|---------|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

¹ Forma: bacilo, coco, cocobacilo, espirilo, otro

² Agrupación: pares, cadena, racimo, ninguno, otro

³ Gram: positivo, negativo, no determinado. BAAR: positivo, negativo, no determinado

Precauciones generales

- Primero prepara todos los frotos de tus muestras, apaga el mechero y posteriormente procede a la tinción.
- No pierdas de vista el objetivo de cada tinción diferencial, cuándo se considera una bacteria Gram positiva, cuándo una Gram negativa, en comparación de una BAAR positiva y de una BAAR negativa.

Disposición de desechos

1. Después de efectuar las observaciones, los portaobjetos se sumergen durante 10 minutos en una solución sanitizante de hipoclorito de sodio al 10% a partir de una solución comercial, después se lavan con detergente líquido, se enjuagan y se sumergen en alcohol al 95% durante 24 horas.
2. En caso de que las preparaciones se rompan, envolverlas en papel, esterilizar en autoclave y desecharlas en el contenedor exclusivo para material roto de vidrio.
3. Los portaobjetos rotos o dañados que se encuentren limpios se colocan directamente en el mismo contenedor.
4. Esterilizar en autoclave los cultivos bacterianos y muestras empleadas y desecharlas.
5. Los desechos de colorantes se colocan en los contenedores dispuestos para este fin en cada laboratorio. Posteriormente se someten a adsorción con carbón activado y el agua libre de colorante es desechada.

Discusión de resultados

1. Comparar los resultados obtenidos de la bacteria X con las cepas control
2. Analizar las posibles causas de error en el procedimiento o los factores que contribuyeron a la correcta tinción de las bacterias en estudio.
3. ¿Puede una bacteria Gram positiva teñirse como una Gram negativa? ¿Por qué?