

PREPARACIONES EN FRESCO

- 1) Si el cultivo es líquido, se coloca una gota entre porta y cubreobjetos y se observa al microscopio. Si el cultivo está en medio sólido, se hace una suspensión en solución salina (NaCl al 0.65 por ciento) y se procede igual que para cultivos líquidos.
- 2) Si se desea hacer la observación en gota pendiente se pone un poco de vaselina alrededor de la depresión de un portaobjetos excavado y con ayuda de una asa bacteriológica se coloca en condiciones de esterilidad una gota de cultivo en el centro de un cubreobjetos.

El portaobjetos excavado se coloca sobre el cubreobjetos tratando que la excavación quede al centro de la gota de cultivo; se hace presión por los bordes para que la vaselina selle a ambos y se invierte de manera que el cubreobjetos quede hacia arriba y la gota de cultivo suspendida; para que ésta no se desprenda es recomendable trabajar con gotas pequeñas.

PREPARACIONES TEÑIDAS

La tinción hace posible determinar las propiedades citoquímicas de los microorganismos frente a ciertos colorantes, así como la presencia de estructuras celulares.

La preparación de frotis se hace sobre portaobjetos limpios y libres de grasa, para lo cual se sumergen por unos minutos en una solución de alcohol o éter.

Sobre el portaobjetos limpio y seco, se deposita una gota de cultivo; si éste procede de un medio sólido, una pequeña cantidad del cultivo se mezcla con una gota de solución salina estéril depositada en el mismo portaobjetos. Con ayuda de una asa bacteriológica, el cultivo se extiende aproximadamente en un área de uno a dos centímetros, se deja secar al aire y se fija por calor pasándolo sobre la parte superior de la flama de un mechero cuatro o cinco veces y después se tiñe.

MÉTODOS DE TINCION

Tinción simple. En esta técnica solo se utiliza un colorante básico y se observa la morfología de la célula.

El portaobjetos con el frotis, se coloca sobre dos varillas de vidrio que previamente se fijaron en forma paralela sobre un recipiente.

Con ayuda de un gotero, se cubre el frotis con cualquiera de los siguientes colorantes: cristal violeta, azul de metileno de Loeffler, solución acuosa o alcohólica de azul de metileno; se mantiene el colorante por 30 segundos, se lava con agua y se seca la preparación entre papel filtro presionando suavemente (procurando no despegar la película). La preparación se observa al microscopio con objetivo de inmersión.

Tinciones diferenciales. La coloración está basada en las diferencias físicas y químicas entre las bacterias y se ponen de manifiesto ciertas estructuras de la morfología bacteriana.

Coloración de Gram. Esta coloración permite observar la propiedad de las bacterias Gram positivas de retener el complejo formado por el colorante cristal violeta y el mordiente lugol tiñéndose de violeta y de las Gram negativas que pierden el complejo y se tiñen de rojo con el colorante de contraste safranina.

Para realizarla se hace lo siguiente:

Preparar un frotis como se hizo para la tinción simple.

Cubrir con cristal violeta y dejar actuar durante un minuto.

Lavar con agua.

Cubrir con lugol y dejar actuar un minuto.

Lavar con agua.

Decolorar con alcohol de 96° hasta que éste no arrastre colorante.

Lavar con agua.

Cubrir con safranina y dejar actuar por 30 segundos.

Lavar con agua.

Secar entre papel filtro.

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Tinción ácido-alcohol-resistente. Ciertos tipos de bacterias presentan resistencia al alcohol ácido y estas generalmente resultan difíciles de teñir con los colorantes habituales. En esta técnica se utilizan colorantes básicos con bastante afinidad por la célula y por lo general se aplican con calor. Las bacterias ácido-alcohol-resistentes, una vez que han tomado este colorante, resisten el tratamiento de decoloración. Esta propiedad, está relacionada con la composición química de la célula y muy especialmente por el alto contenido de lípidos.

La técnica más empleada es la Ziehl Neelsen que utiliza fucsina fenicada como colorante primario, alcohol ácido como agente decolorante y azul de metileno como colorante de contraste. Las bacterias ácido-alcohol-resistentes se tiñen de rojo y las que no lo son, de color azul.

Para realizar la técnica de Ziehl Neelsen se hace lo siguiente:

Preparar un frotis como se hizo para la coloración simple.

Colocar el portaobjetos sobre un recipiente con agua en ebullición para hacer calentamiento por vapor.

Colocar sobre el frotis un trozo de papel filtro y sobre él agregar fucsina fenicada. Dejar actuar durante 5 a 10 minutos. Reponer continuamente el colorante evaporado, evitando poner un exceso del mismo.

Deje enfriar la preparación a temperatura ambiente.

Lavar con agua.

Decolorar con alcohol ácido durante 30 segundos o hasta que no se arrastre más colorante.

Lavar con agua.

Cubrir la preparación con solución de azul metileno y dejar actuar durante un minuto.

Lavar con agua.

Secar entre papel filtro.

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Los bacilos ácido-alcohol-resistentes se observarán de color rojo.

Tinción de esporas. La observación de esporas bacterianas permite además de conocer su presencia, determinar su forma, tamaño y posición dentro de la célula vegetativa.

Para realizar esta tinción, se requiere de ciertos métodos que permitan la penetración del colorante primario, ya sea recurriendo al calor o a una exposición prolongada del colorante.

Método de Bartolomew Mettwer (exposición prolongada del colorante).

Preparar un frotis como se hizo para la tinción simple.

Fijarlo por calor, pasándolo de 20 a 25 veces por la flama de un mechero.

Cubrir la preparación con solución acuosa al 7.6 por ciento de verde de malaquita durante 10 minutos.

Lavar con agua.

Cubrir con solución acuosa de safranina al 0.25 por ciento durante 15 segundos.

Lavar con agua.

Secar entre papel filtro.

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Las esporas se tiñen de verde y la célula vegetativa de rojo.

Los agentes causales de infección en peces generalmente no forman esporas.

Tinción de cápsulas. La cápsula de las bacterias presenta diferente afinidad a los colorantes en comparación con otras estructuras celulares.

Se pueden utilizar métodos en donde la cápsula se observa por contraste o bien teñida; este último se considera más eficaz, ya que la cápsula se contrasta con respecto a la célula y el resto del campo.

Método de Leifson. Preparar un frotis como se hizo en la tinción simple.

Dejarlo secar al aire (no fijar por calor).

Cubrir la preparación con solución colorante de Leifson durante 10 minutos.

Lavar con agua.

Cubrir con solución colorante de borax-azul de metileno y dejar actuar por cinco minutos.

Lavar con agua.

Secar entre papel filtro.

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Las cápsulas se teñirán de rojo y las células de azul.

Tinción de flagelos. Los flagelos son estructuras termolábiles y sus diámetros están por debajo de los límites del poder de resolución del microscopio óptico; por lo tanto, para colorearlos, es necesario manejar cuidadosamente la muestra y utilizar técnicas especiales.

El método de Gray, utiliza un mordiente que cubre la superficie del flagelo, aumentando aparentemente su grosor y a su vez proporcionando una capa de material teñible para captar el colorante.

METODO DE GRAY

Pasar un portaobjetos tres a cuatro veces sobre la flama de un mechero.

Preparar una suspensión de la bacteria en agua estéril. Sobre el portaobjetos flameado y frío, colocar cinco gotas de la suspensión (cuatro gotas en las esquinas y una en el centro).

Dejar secar la preparación al aire NO CALENTAR.

Cubrir con el mordiente durante 10 minutos.

Lavar con agua, tratando de no arrastrar la preparación.

Cubrir con solución de carbol-fucsina durante 5 a 10 minutos.

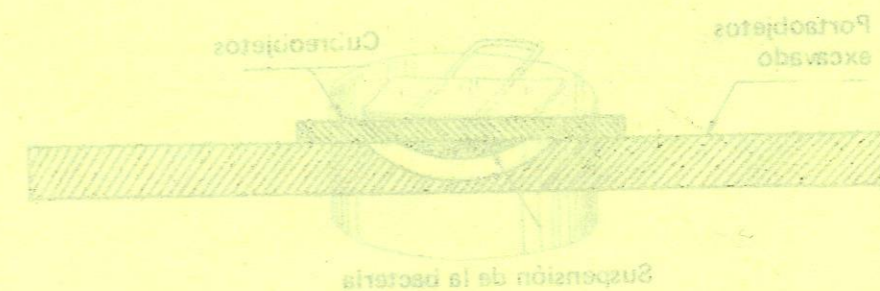
Lavar con agua.

Dejar secar al aire.

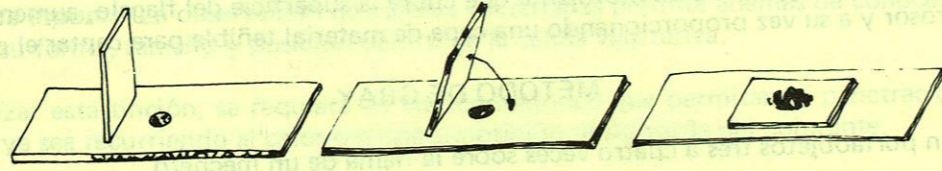
Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Los flagelos se observarán de color rojo.

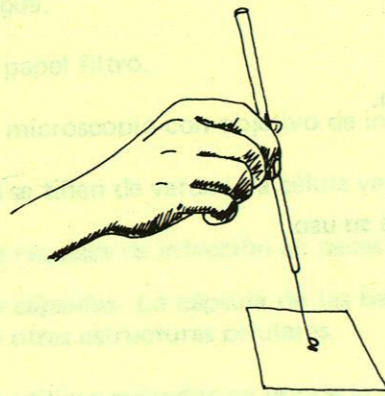
El mordiente deberá ser preparado el mismo día de su uso.



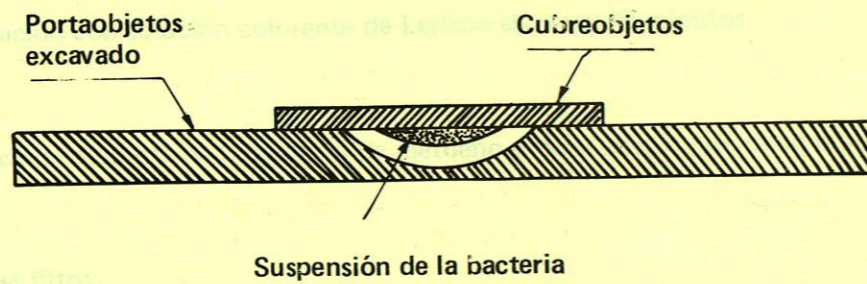
PREPARACIONES EN FRESCO



1) Observaciones entre el portaobjetos y el cubreobjetos.

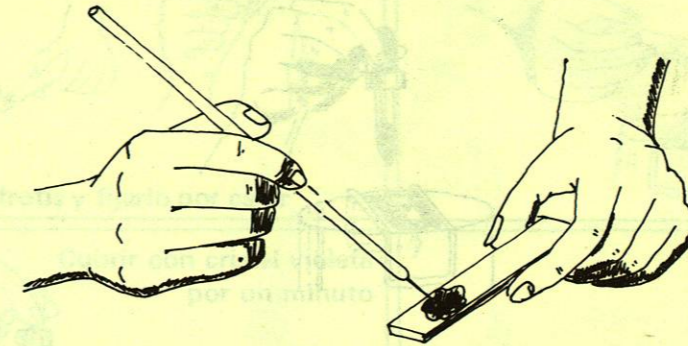


Colocacion de una gota de cultivo sobre un cubreobjetos

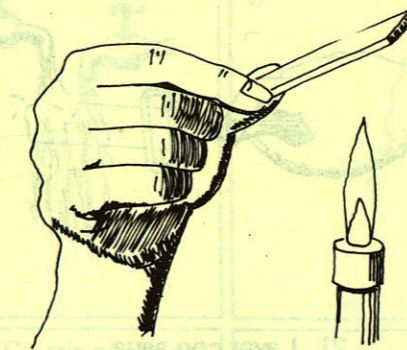


2) Observación por gota pendiente.

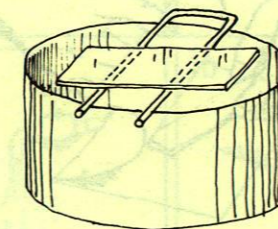
PREPARACIONES TEÑIDAS



1) Preparación de un frotis.

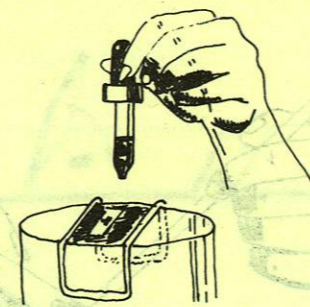


2) Fijación de un frotis por calor.

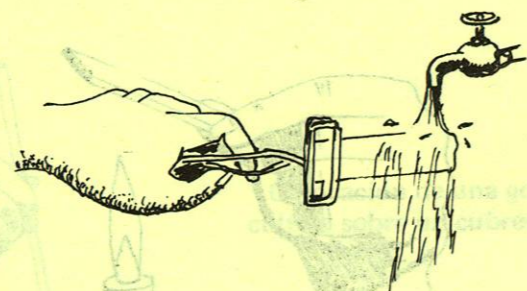


3) Colocación del portaobjetos al realizar una tinción.

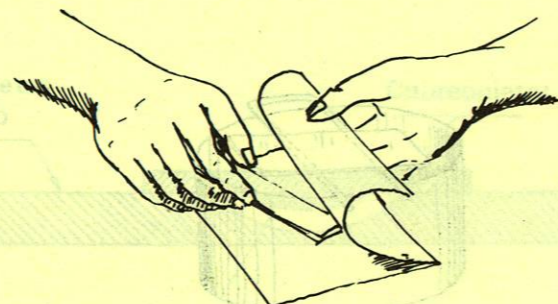
TINCION SIMPLE



1) Cubrir con colorante básico durante 30 segundos.

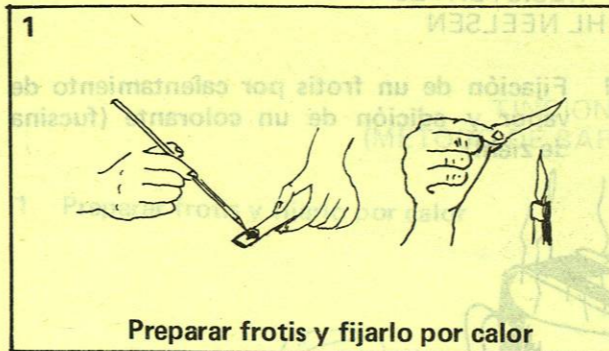


2) Lavar con agua.

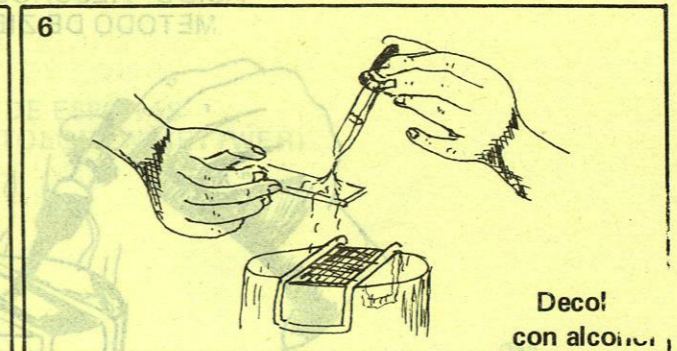


3) Secar entre papel filtro.

TINCION DE GRAM



1 Preparar frotis y fijarlo por calor



6 Decolorar con alcohol



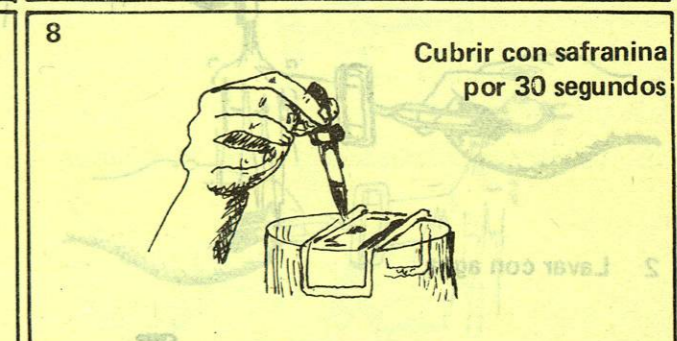
2 Cubrir con cristal violeta por un minuto



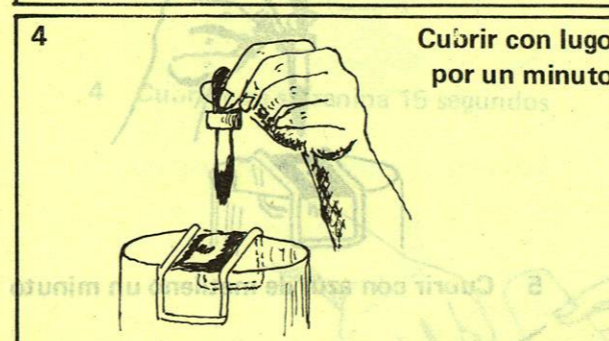
7 Lavar con agua



3 Lavar con agua



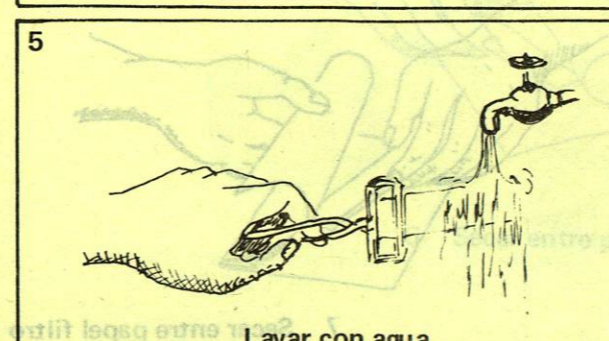
8 Cubrir con safranina por 30 segundos



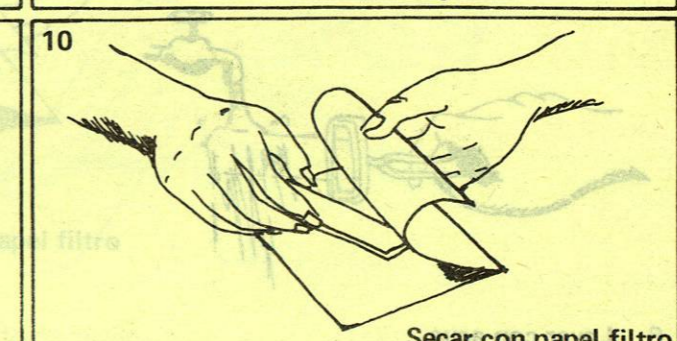
4 Cubrir con lugol por un minuto.



9 Lavar con agua

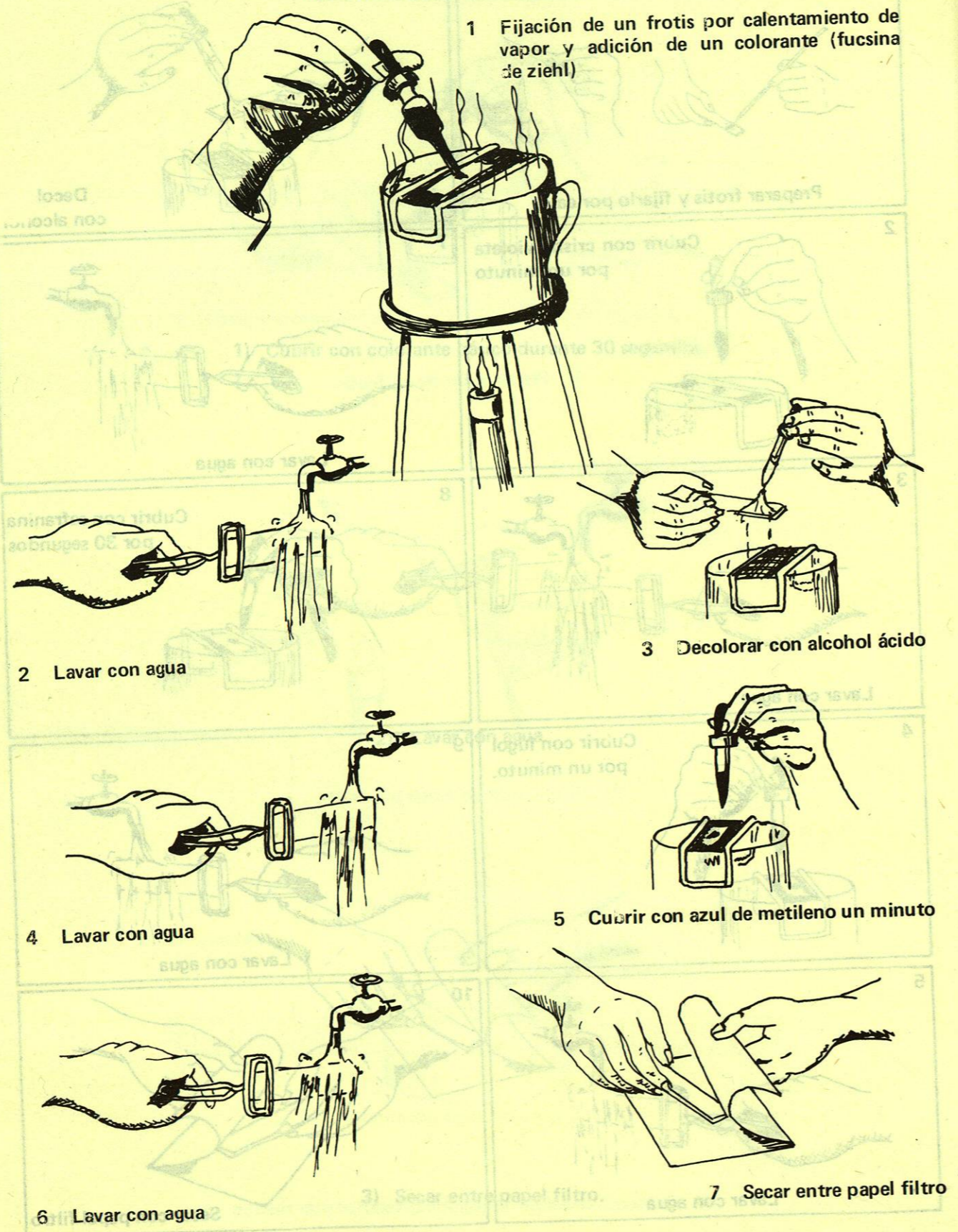


5 Lavar con agua



10 Secar con papel filtro

TINCION PARA BACTERIAS
ACIDO-ALCOHOL-RESISTENTES
METODO DE ZIEHL NEELSEN



1 Fijación de un frotis por calentamiento de vapor y adición de un colorante (fucsina de ziehl)

2 Lavar con agua

3 Decolorar con alcohol ácido

4 Lavar con agua

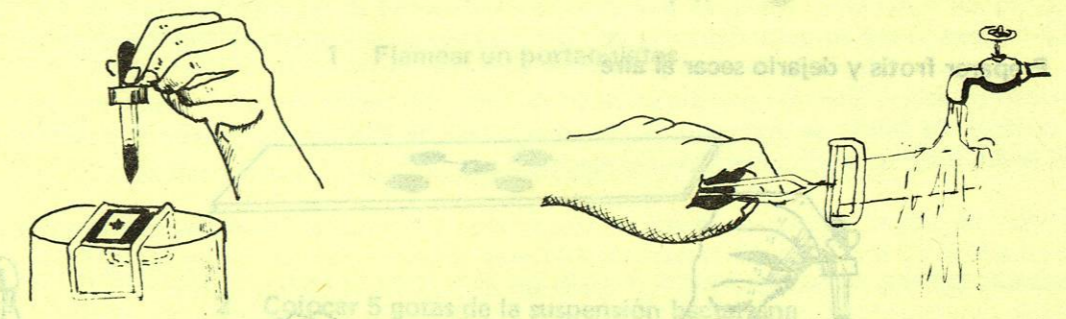
5 Cubrir con azul de metileno un minuto

6 Lavar con agua

7 Secar entre papel filtro

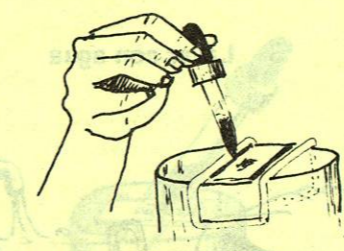
TINCION DE ESPORAS
(METODO DE BARTOLOMEW METTWER)

1 Preparar frotis y fijarlo por calor

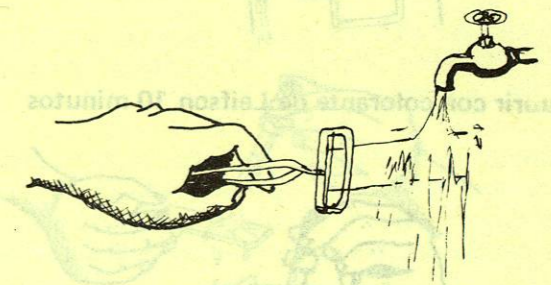


2 Cubrir con verde de malaquita 10 minutos

3 Lavar con agua



4 Cubrir con safranina 15 segundos

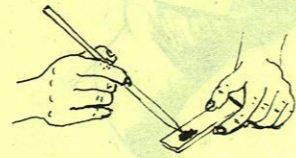


5 Lavar con agua

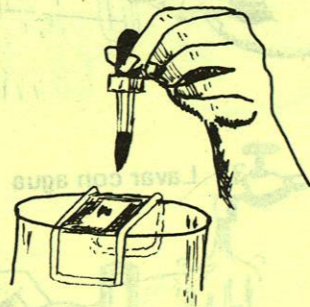


6 Secar entre papel filtro

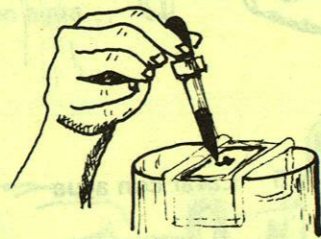
TINCION DE CAPSULAS
(METODO DE LEIFSON)



1 Preparar frotis y dejarlo secar al aire



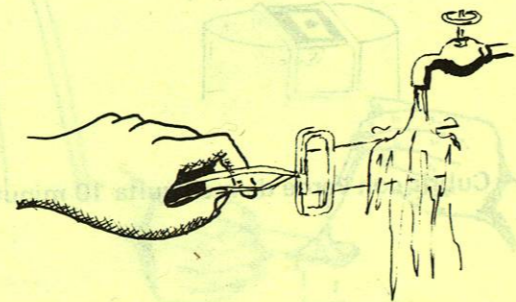
2 Cuñrir con colorante de Leifson 10 minutos



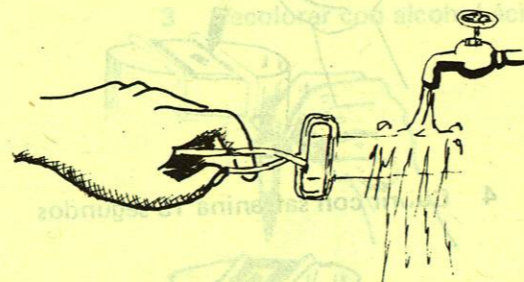
4 Cuñrir con borax azul de metileno 5 minutos



6 Secar entre papel filtro

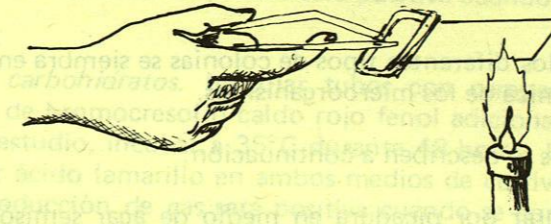


3 Lavar con agua

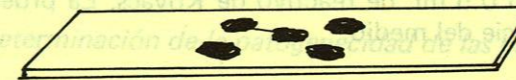


5 Lavar con agua

TINCION DE FLAGELOS
(METODO DE GRAY)

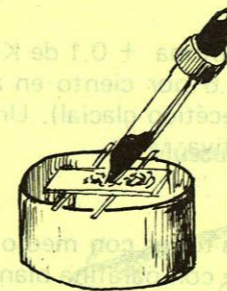


1 Flamear un portaoojetos

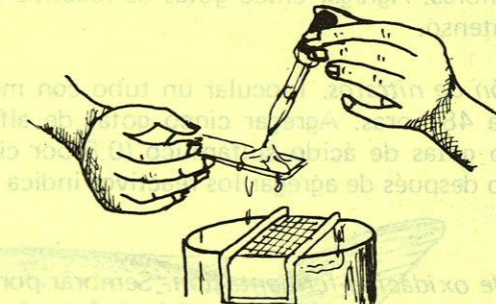


2 Colocar 5 gotas de la suspensión bacteriana

3 Secar al aire. No calentar



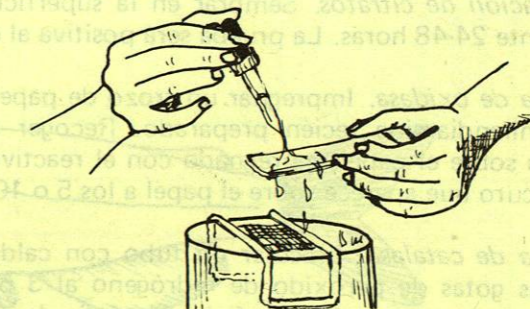
4 Cuñrir con mordiente 10 minutos



5 Lavar con agua



6 Cubrir con carbol fucsina 5-10 minutos



7 Lavar con agua

8 Secar al aire