

Técnicas de observación de microorganismos

El examen microscópico es el primer paso para el estudio de las muestras microbiológicas. Es un examen orientativo que nos proporciona datos como la presencia de bacterias, su morfología, movilidad y características tintoriales y estructurales.

Los microorganismos obtenidos a partir de una muestra clínica pueden verse vivos o muertos, aunque para la investigación de algunas características biológicas como la movilidad, es necesario observarlos vivos.

Las técnicas de observación microscópica de microorganismos pueden dividirse en:

- A. Examen en fresco (preparaciones sin teñir)**
 - preparación entre porta y cubre
- B. Examen de preparaciones coloreadas:**
 - de gérmenes vivos -> coloración vital
 - de gérmenes muertos -> tinciones
- C. Estudio de la movilidad bacteriana**
 - gota pendiente

A. Examen en fresco (preparaciones sin teñir)

Consiste en observar los microorganismos vivos que puede haber en el producto examinado, sin fijación ni tinción, en suspensión acuosa, pudiendo objetivar su cantidad, sus características morfológicas y su movilidad.

Es una técnica de fácil realización, en la que el producto a examinar se sitúa entre porta y cubre. Si el material procede de una toma en medio sólido o de una toma directa, se emulsionará en una gota de agua destilada o solución salina. Si el material es líquido se depositará directamente entre porta y cubre.

El volumen de la gota debe ser adecuado a las dimensiones del cubreobjetos ya que, en caso contrario, un exceso de líquido se traducirá en un desbordamiento de éste bajo los límites del cubre, o un cubre "flotante" que dificultará nuestra observación por la formación de corrientes líquidas.

Si el producto va a permanecer mucho tiempo en el portaobjetos, es conveniente prevenir la desecación mediante la aplicación de parafina en los bordes inferiores del cubreobjetos.

La observación se realiza, en general, con objetivo de 40x en microscopio de campo claro. La microscopía de contraste de fases y de campo oscuro facilita mucho la visión en fresco.

Los exámenes en fresco permiten, además, observar la presencia de otros elementos formes, como leucocitos, cristales, etc., que pueden ser de gran ayuda en la valoración de las muestras.

B. Examen de preparaciones coloreadas

Las técnicas de coloración permiten la observación morfológica con un mejor contraste que en el examen en fresco, así como la observación de estructuras celulares. El examen microscópico de preparaciones teñidas tiene una serie de pasos comunes previos a la tinción, que son:

Preparación del frotis:

- La extensión del material sobre el portaobjetos se hará de diferentes formas, en función de la procedencia del producto a examinar. Si el producto es líquido, se depositará una pequeña (muy pequeña) cantidad de material en el centro del porta, extendiéndolo con el asa hasta conseguir una capa fina y homogénea.
- Si la extensión debe hacerse a partir de un cultivo en medio sólido, la colonia que vayamos a estudiar se mezclará con una gotita de agua destilada estéril colocada en el centro del porta. Conviene recordar que no es necesario depositar una gran cantidad de producto, pues se dificultaría la visualización, y que un exceso de agua solo contribuye a aumentar el tiempo en secar la preparación.
- Por último, si el producto se ha recogido con una torunda (exudados) debe extenderse directamente sobre el portaobjetos, procurando que el algodón "ruede", en vez de "frotar" el porta; de esta manera se consigue preservar mejor los elementos celulares que pudiesen acompañar a las bacterias, a la vez que se conserva la agrupación de éstas, en caso de que la hubiere.

Secado:

- Una vez efectuada la extensión del frotis debemos dejar secar al aire la preparación.
- Cuando la preparación está seca, la superficie del frotis pasa de ser brillante a mate.
- El secado se puede acelerar calentando ligeramente la parte inferior del porta.

Fijado:

- El último paso antes de proceder a la tinción es la fijación de la preparación al portaobjetos, mediante la coagulación rápida de las proteínas citoplasmáticas. Con esto conseguimos que el producto adherido al portaobjetos no sea eliminado, ni vea alteradas sus características morfológicas y estructurales en los procedimientos de tinción posteriores.
- La fijación puede hacerse por calor suave, pasando el porta sobre una llama o mediante la utilización de placas calefactoras especiales a 37°C.
- Tras la fijación por calor es muy importante esperar a que la preparación se enfríe antes de proceder a realizar cualquier procedimiento de tinción.
- Si el material que vamos a teñir puede poseer abundante material celular (leucocitos, células epiteliales, etc.) que conviene visualizar también, es preferible recurrir al alcohol metílico para fijar la preparación.
- Una vez cubierta de alcohol la preparación, se deja actuar durante un minuto, eliminando después el exceso y dejando secar a temperatura ambiente.

Coloración o tinción:

- La tinción consiste en cubrir la preparación con uno o varios colorantes de forma secuencial durante un tiempo determinado.
- La adición de un colorante a un frotis sin enfriar puede provocar la precipitación del colorante y la visualización de artefactos que pueden confundirnos en el proceso de observación al microscopio.
- Tras la tinción, la preparación se lava con agua, procurando que el chorro no caiga con fuerza sobre la preparación y finalmente se seca al aire o mediante absorción con papel.

Tipos de preparaciones coloreadas:

Tinciones simples

- Azul de metileno
- Cristal violeta
- Fucsina

Tinciones dobles, compuestas o diferenciales

- Tinción de Gram
- Tinción de Ziehl-Nielsen
- Tinción de Tam-Thiam-Hok

Tinciones estructurales

- Tinción de cápsulas
- Tinción de flagelos
- Tinción de esporas
- Tinción de corpúsculos metacromáticos

Tinciones especiales:

- Tinción negativa
- Tinciones fluorescentes
 - Tinción de auramina-rodamina
 - Tinción con naranja de acridina

Tinciones simples

Las tinciones simples se utilizan para observar la morfología y el agrupamiento bacterianos. Cualquier colorante es válido para este tipo de tinción, aunque los más utilizados habitualmente son:

- Azul de metileno
- Cristal violeta
- Fucsina

El método para realizar una tinción simple es bien sencillo:

- 1) hacer un frotis sobre un porta, secar y fijar,
- 2) cubrir la preparación con el colorante elegido, durante el tiempo especificado,
- 3) lavar con agua, arrastrando todo el exceso de colorante,
- 4) secar al aire o al calor suave,
- 5) observar al microscopio a 1000x con objetivo de inmersión (y aceite)

Las bacterias se verán teñidas del mismo color que el colorante que se utilizó.

Tinciones diferenciales

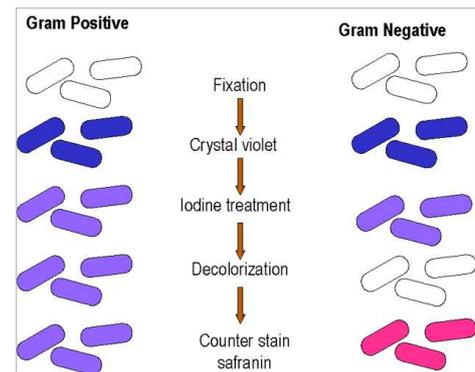
Se utilizan para poner de manifiesto diferencias estructurales entre bacterias

Tinción de Gram:

Es la coloración diferencial más utilizada en Microbiología, ya que diferencia a las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, según retengan o no el cristal violeta utilizado en la tinción.

Prácticamente todos los autores están de acuerdo en utilizar esta tinción como primer paso en la identificación bacteriana. Su importancia reside en que una incorrecta interpretación puede hacer variar el número de pruebas subsiguientes destinadas a efectuar la identificación, alejándonos considerablemente del género y especie verdaderos.

El fundamento de esta tinción se basa en la incapacidad de las bacterias Gram negativas para retener el complejo cristal violeta - lugol cuando son decoloradas por una mezcla de alcohol y acetona. Las bacterias Gram positivas, que no son decoloradas por el alcohol acetona, retienen el colorante inicial (cristal violeta) y mostrarán esa coloración al final de la técnica. Las bacterias Gram negativas cogerán el segundo colorante (safranina) y se mostrarán como bacterias de color rojo.



Resultados:

Bacterias Gram positivas: se verán de color violeta o azul intenso.

Bacterias Gram negativas: se observarán de color rojo.

Observaciones:

El lugol se utiliza como mordiente (no como colorante), para favorecer la retención del cristal violeta por parte de las bacterias Gram positivas.

Los cultivos viejos (más de 24 horas) pueden hacerse más sensibles a la decoloración, pudiendo aparecer como Gram negativas bacterias que no lo son.

Tinción de Ziehl Neelsen

Se utiliza para objetivar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en una muestra o preparación.

El método utiliza un procedimiento similar al de la tinción de Gram, es decir: coloración inicial, decoloración y adición de un contracolorante o colorante de contraste.

Tras la preparación del frotis, secado y fijación se procede como sigue:

1. Cubrir la preparación **totalmente** con carbol-fucsina o fucsina fenicada
2. Calentar la preparación hasta la emisión de vapores tres veces, dejando que se enfríe.
3. Lavar y decolorar con alcohol clorhídrico al 3% hasta que no suelte más colorante rojo.
4. Lavar y cubrir con azul de metileno durante unos minutos.
5. Lavar, secar y observar con objetivo de inmersión.

Las bacterias ácido alcohol resistentes quedan teñidas de rojo y las que no lo son, de azul.

Tinción de Tan-Thiam-Hok

Esta coloración permite una tinción más rápida que el clásico procedimiento de Ziehl-Neelsen y evita la necesidad de calentamiento.

El resultado es el mismo que en la tinción anterior, observándose los microorganismos ácido alcohol resistentes de color rojo.

Tinciones estructurales

Tinción de esporas

Se realizan para poner de manifiesto las formas de resistencia de las bacterias (esporas) y su localización en la célula.

Suelen utilizarse colorantes muy concentrados y tinción forzada por calentamiento hasta emisión de vapores.

Uno de los métodos más utilizados es el método de Wirtz o del verde de malaquita, que consiste en la utilización de este colorante en caliente y posterior utilización de fucsina diluida como contracolorante.

Tras la tinción las esporas, si existen, se observan de color verde, mientras que las formas vegetativas aparecen de color rojo.

Tinción de flagelos

La observación de flagelos en preparaciones teñidas es muy difícil, debido a que se retraen con mucha facilidad y se adhieren a la pared celular.

Se deben utilizar cultivos jóvenes (de menos de 24 horas), sembrados en agar semisólido, empleándose técnicas que engruesan los flagelos para facilitar su observación.

Tras la realización de la delicada técnica (extensión por inclinación -sin asa-, secado sin calor, fijación con vapores de óxido de osmio) los flagelos aparecen visibles al microscopio debido al precipitado de plata formado a su alrededor.

Tinción de cápsulas

La cápsula es una capa gelatinosa, de espesor variable, situada alrededor de la pared celular bacteriana. Como es difícil teñirlas, se consiguen mejores resultados utilizando métodos que, coloreando el fondo de la preparación y el microorganismo, hacen resaltar las cápsulas sin teñir.

El método más utilizado es el de Burri o de la tinta china, en el que se tiñen primero los microorganismos con fucsina diluida y posteriormente se cubre la preparación con tinta china.

Tras el procedimiento de tinción, se observan sobre un fondo negro los microorganismos teñidos de rojo y la cápsula como un halo blanco que los rodea.

Tinción de corpúsculos metacromáticos:

Los corpúsculos metacromáticos son gránulos de reserva de fosfato del microorganismo, que al teñirlos dan el color complementario al colorante utilizado. Solo aparecen en el género *Corynebacterium*.

Se utilizan varios métodos para su visualización (Neisser, Loeffler y Albert), dependiendo el resultado final del método utilizado.

Tinciones especiales

Tinción negativa:

Es una técnica intermedia entre las tinciones propiamente dichas y la observación en fresco, ya que carece de las etapas de fijación y coloración. Se utiliza, sobre todo, para estudios de tipo morfológico.

Tras la tinción con nigrosina, los microorganismos aparecen incoloros sobre un fondo negro.

Tinción de auramina -rodamina

Estos dos fluorocromos se fijan selectivamente sobre el ácido micólico de la pared celular de las micobacterias, por lo que la investigación de éstas es su principal aplicación.

Tras la tinción, los microorganismos aparecen como puntos amarillos o amarillo-verdosos brillantes sobre fondo negro.

Es una tinción equivalente a la de Ziehl-Neelsen, aunque mucho más sensible y específica.

Tinción de naranja de acridina:

Se basa en la tinción selectiva y diferencial de los ácidos nucleicos por parte del fluorocromo naranja de acridina. Se utiliza en la investigación de muestras con escaso número de microorganismos.

Tras la tinción, los microorganismos se observan con un color rojo-anaranjado, mientras que otras células o restos de tejidos presentes en la muestra aparecen con una fluorescencia amarillo-verdosa.

C. Estudio de la movilidad bacteriana.

Las bacterias pueden tener la capacidad de desplazarse en suspensiones líquidas gracias a los flagelos. La observación de esta característica puede ser muy importante en el proceso de identificación bacteriana.

El estudio de la movilidad realizado mediante la observación entre porta y cubre de una gota de caldo de cultivo de varias horas de crecimiento puede inducir a error al confundir el movimiento bacteriano con el "arrastre" de bacterias que se produce por las corrientes líquidas que se generan hasta que se equilibra el componente líquido entre porta y cubre.

Técnica de la gota pendiente:

La técnica de la gota pendiente consiste en la observación de una pequeña cantidad de suspensión de microorganismos en fase de crecimiento exponencial en medio líquido, pero exenta de las fluctuaciones provocadas por las corrientes líquidas que se generan entre porta y cubre.

Para la realización de la técnica de observación mediante el método de la gota pendiente, se utilizan unos portas especiales con una o dos excavaciones que permiten colocar un cubreobjetos invertido del que pende una pequeña gota de la suspensión bacteriana que vamos a observar.

El tamaño de la gota debe ser lo suficientemente pequeño como para evitar su contacto con el porta y lo suficientemente grande para evitar una rápida desecación durante el tiempo de observación.

Es importante saber diferenciar el movimiento browniano de partículas en suspensión con el movimiento real producido por los microorganismos.

Las repetidas observaciones prácticas de diferentes microorganismos os permitirán distinguir perfectamente estos movimientos.

La técnica será explicada en una clase práctica. ¡No os la perdáis!