

ZIEHL NEELSEN INTERRUMPIDO PARA COLORACIÓN DE ESTRUCTURAS FÚNGICAS

Roberto Ventura Flores^{1,a}

RESUMEN

Se empleó la técnica de microcultivo para mostrar y mantener las estructuras fructíferas de *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* y *Sporothrix schenckii* que son observados directamente con azul de lactofenol a fin de diferenciar morfológicamente estructuras compatibles de cada especie, pero en esas condiciones no son permanentes. Siendo una alternativa la tinción Ziehl Neelsen interrumpida para la coloración de estructuras fúngicas que muestren el mínimo daño y sean de utilidad en la docencia como material de referencia.

Palabras clave: Coloración; Estructuras fúngicas (Fuente: DeCS- BIREME).

ZIEHL - NEELSEN INTERRUPTED FOR COLORATION OF FUNGAL STRUCTURES

ABSTRACT

Microculture technique was used to display and maintain the fruiting structures of *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* and *Sporothrix schenckii*, which are observed directly lactophenol blue to differentiate morphologically support structures of each species but in these conditions are not permanent. Being an alternative the Ziehl Neelsen staining interrupted to the coloring of fungal structures that show minimal damage and are useful in the teaching as reference material.

Key words: Staining; Fungal structures (Source: MeSH-NLM).

INTRODUCCIÓN

El examen directo es de ayuda para el diagnóstico presuntivo de micosis, donde el uso del hidróxido de potasio (KOH) al 10% favorece disolver la queratina, digiere el material proteico, aclara los pigmentos y separa las células sin afectar la morfología de los elementos fúngicos^(1,2), mientras que el azul de lactofenol, es útil para examinar el material fúngico obtenidos de cultivos. En ella, el fenol mata al hongo y flora acompañante, el ácido láctico es un agente aclarante que preserva la estructura del hongo, la glicerina previene la disecación y el azul colorea la quitina del hongo^(2,3).

Las tinciones son herramientas que se utilizan en el laboratorio de microbiología para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, existiendo una gran variedad de coloraciones que han sido desarrollados para la detección de diferentes agentes como; bacterias, parásitos y hongos⁽⁴⁾. Así la coloración Gram es empleada para observar *blastococonidias* y *pseudomicelios* del género *Candida*, *Malassezia* y *Criptococcus*, en tanto que la coloración Giemsa es de utilidad para el diagnóstico de histoplasmosis^(1,3).

Sin embargo en la tinción de microcultivos es empleado el azul algodón ácido y la eritrosina que además de usar el xilol⁽⁵⁾ no están disponibles en cualquier laboratorio, por ello fue objetivo del presente trabajo obtener coloraciones permanentes de estructuras fúngicas usando el Ziehl Neelsen interrumpido como alternativa accesible y reproducible en nuestro medio.

TEXTO DE LA COMUNICACIÓN

Se realizó cultivos en lámina según la técnica de microcultivo⁽⁵⁾ de *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* y *Sporothrix schenckii* obtenidos de cepas almacenados en el laboratorio de Micología del Hospital Regional Lambayeque. Concluido el microcultivo, las laminillas fueron retiradas y fijadas con metanol a fin de preservar la arquitectura de la pared celular. La laminilla fue colocado en posición invertida para disminuir la probabilidad de precipitación del colorante (figura 1a) y luego se procedió a:

1. Cubrir las laminillas con fucsina básica / azul de metileno filtrada.

¹ Laboratorio de Investigación, Hospital Regional Lambayeque. Chiclayo, Perú.

^a M.Sc. Microbiología Clínica.

2. Calentar suavemente con un mechero hasta la emisión de vapores.
3. Dejar durante 5 minutos.
4. Eliminar la fucsina básica con agua corriente y decolorar con alcohol al 96 %.
5. Lavar ligeramente con agua y dejar secar.

Respecto al azul de metileno se realizó similar procedimiento, pero en este caso no se decoloró con alcohol al 96 %. Hecha la coloración se procedió al montaje con resina entellan (figura 1b), así las preparaciones obtenidas fueron observadas y fotografiadas a 400 aumentos, apreciándose más nítido los colores azules y fucsia en los microconidios y lóculos de los macroconidios que las hifas (figuras 2a al 2d).

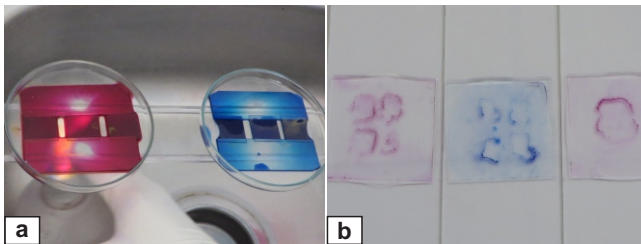


Figura 1. Coloración Ziehl Neelsen interrumpido y montaje de laminillas: a) Laminillas en posición invertida en placa petri con fucsina básica y azul de metileno y b) Montaje de laminillas con resina entellan.

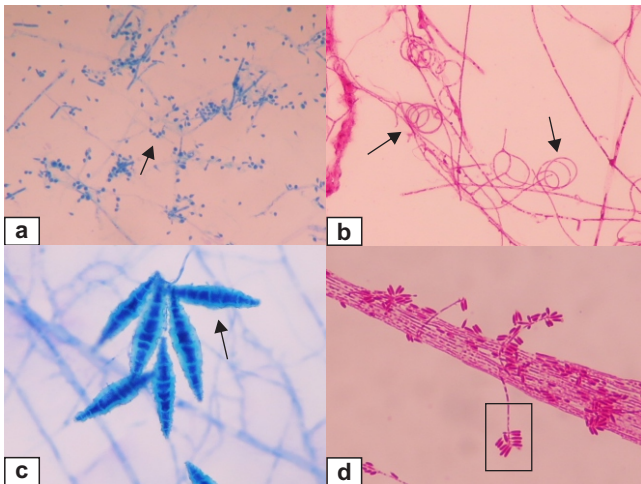


Figura 2. Observación microscópica 40x de laminillas coloreadas con Ziehl Neelsen interrumpido: a) Microconidios libres, redondos y periformes de *Trichophyton mentagrophytes*; b) Zarcillo e hifas en espiral; c) Macroconidios de *Microsporium canis* con más de seis células o lóculos; d) Conidióforo de *Sporothrix schenckii* con Microconidios o simpoduloconidios en flor de margarita.

DISCUSIÓN

La tinción Ziehl Neelsen interrumpida constituye una alternativa para la coloración de estructuras fúngicas debido a la afinidad que existe por los componentes de la pared celular constituido por polisacáridos, polipéptidos, lípidos y quitina⁽⁶⁾ y en función de ella también existe la predisposición de las mucoproteínas y mucopolisacáridos por el ácido periódico de schiff (PAS)⁽¹⁾; siendo el uso de la fucsina básica y el azul de metileno útil para la coloración de hifas y conidios.

Las observaciones microscópicas permiten establecer que las hifas presentaron menor nitidez en comparación de

microconidios y macroconidios, esta característica estaría relacionada a la mayor concentración de polisacáridos por parte de los conidios⁽⁶⁾, pero también al efecto del calentamiento con la flama del mechero que permitió el ingreso del colorante, al cambiar el estado físico de la pared celular⁽⁴⁾. Todo esto indica que la fucsina básica y el azul de metileno poseen capacidad de interactuar con las biomoléculas de la pared celular de hifas y conidios de los hongos empleados.

La técnica desarrollada constituye una alternativa sencilla y reproducible para colorear, conservar y mantener la disposición de las estructuras fúngicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Negroni R, Guelfand L. Manual de procedimientos para laboratorios de Micología Médica. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, federación bioquímica, Buenos Aires-Argentina. 1999 - suplemento 1. p. 1-59.
2. Arango A, Moreno N. Diagnóstico micológico: del examen directo a los métodos Moleculares. Rev Asoc Colomb Dermatol. 2012; 20 (1): 76-82.
3. Guevara M, Urcia F, Casquero J. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de Micosis Humanas. Serie de normas técnicas N° 44. Instituto Nacional de Salud, Lima; 2007.
4. López LE, Hernández M, Colín CA, Ortega S, Cerón G, Franco R. Las tinciones básicas en el laboratorio de Microbiología. Investigación en discapacidad. 2014; 3 (1): 10-18.
5. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 4ª ed. McGraw-Hill, México Df México; 2012.
6. Arenas R. Micología Médica ilustrada. 4a ed. McGraw-Hill, México Df; 2011.

Revisión de pares:

Recibido:2/5/15 Aceptado:24/6/15