

Optimización de la tinción de gram para su aplicación en tejidos

Esthelfania Guadalupe Gutiérrez-Arenas^a, Aida Noemi Tavera-Valdez^b, Alberto Niderhauser-García^b, Gilberto Jaramillo-Rangel^b, Marta Graciela Ortega-Martínez^{b*}

^a Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Sinaloa, Calzada de las Américas y Universitarios, Culiacán 80040, México.

^b Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ave. Madero S/N, Monterrey 64460, México.

*E-mail. martaortega69@yahoo.com.mx

Palabras clave: Optimización, Tinción, Bacterias.

Introducción

La tinción de Gram es una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico microbiológico. Su capacidad para evidenciar la morfología bacteriana y distinguir entre bacterias grampositivas y gramnegativas, la convierten en una gran herramienta para la detección de presuntos agentes patógenos, desarrollo de un diagnóstico inicial y abordaje terapéutico preliminar [1-3]. En la práctica clínica, pueden surgir situaciones en las que el establecimiento de la etiología de determinadas infecciones bacterianas se encuentre limitado a hallazgos histopatológicos [4]. A pesar de que la tinción de Gram convencional funciona muy bien para identificar bacterias en extendidos de muestras líquidas, su aplicación a secciones tisulares no es apropiada, ya que debido a la utilización de solventes como etanol y xilol, después de cualquier tinción y previo al montaje de las laminillas, tanto el tejido de las biopsias como las bacterias palidecen, y se hace difícil la observación en detalle del tejido y la determinación del gram de las bacterias.

Se han desarrollado tinciones de Gram modificadas, las cuales varían en el decolorante y la contratinción que utilizan. Entre ellas se encuentra la técnica de Brown-Hopps, en la cual las bacterias grampositivas se tiñen de color azul y las bacterias gramnegativas de color rojo púrpura, en un fondo tisular amarillo, siendo esto último lo que permite resaltar la presencia de las bacterias, pero se pierde el detalle del tejido [5].

Nuestro objetivo fue optimizar la tinción de Gram para su aplicación en tejidos incrementando la posibilidad de observar el patrón histopatológico subyacente a la enfermedad.

Metodología

Se utilizaron cortes seriados de biopsias de riñón y piel de pacientes previamente diagnosticados histopatológicamente con pielonefritis o micetoma, respectivamente. Estas secciones fueron desparafinizadas en xilol e hidratadas. Se aplicaron los reactivos de la tinción de Gram. Posteriormente, las secciones se sumergieron en agua de la llave de 5 minutos a tres horas (dependiendo del tejido) con el fin de liberar el exceso de colorante. Por último, las secciones se deshidrataron utilizando butanol en lugar de etanol, o bien fueron secadas al aire, y finalmente se montaron. Con el fin de comparar los resultados obtenidos con la tinción de Gram optimizada, también se realizó la tinción de Brown-Hopps en los cortes seriados descritos anteriormente. Se utilizó un microscopio de campo claro que tiene acoplada una cámara. Se capturaron imágenes de alta resolución a color de las secciones en un aumento total de 400x y 1000x.

Resultados y discusión

En las secciones de pielonefritis y micetoma que fueron sumergidas en agua durante 5 minutos y tres horas, respectivamente, tras haber sido teñidas con la técnica de Gram, fue posible observar la liberación gradual del exceso de colorante captado por el tejido, lo cual, aunado a nuestro método de deshidratación, mejoró el contraste y permitió detectar las bacterias y apreciar con más detalle la morfología tisular.

La morfología tisular se distingue más con la técnica de Gram optimizada y es posible detectar bacterias más eficientemente que con la tinción de Brown-Hopps. Es interesante apreciar que muchas de las mejoras en las técnicas experimentales provienen, como en este caso, de cambios que aparentan ser sencillos o hasta obvios. Por ejemplo, Becerra y colaboradores modificaron la tinción de Gram convencional simplemente al añadir alcohol azafranado al momento de deshidratar el tejido tras teñirlo con la técnica de Gram tradicional, favoreciendo considerablemente la detección bacteriana (aunque el fondo seguía siendo amarillo) [6].

Una desventaja de la tinción de Gram optimizada es el tiempo que se invierte al sumergir las secciones tisulares en agua. Sin embargo, en nuestra experiencia, el tiempo máximo invertido en este paso fue de tres horas, pudiendo ser tan breve como de 5 minutos. A pesar de ello, consideramos que nuestra técnica tiene potencial, ya que actualmente los patólogos siguen empleando la tinción de H y E para la detección de bacterias. Su interpretación en tejidos con tal fin puede ser subjetiva y llevar a diagnósticos no concluyentes o incorrectos, en cuanto a la presencia o ausencia de los microorganismos [6].

Conclusiones

La tinción de Gram optimizada en este trabajo permite la detección oportuna de bacterias grampositivas y gramnegativas en tejidos, así como la apreciación de la morfología tisular. Por lo tanto, podría ser de gran apoyo en el entorno clínico para el anatomo-patólogo en el diagnóstico de infecciones por este tipo de agentes.

Referencias

1. Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. *Medical Microbiology*, 8th ed.; Elsevier: Philadelphia, 2016; pp 106-108.
2. Boyanova, L. J. *Postgrad Med* **2017**, *130*, 105-110.
3. Beveridge, T. J. *Biotech Histochem* **2001**, *76*, 111-118.
4. Imrit, K.; Goldfischer, M.; Jie, W.; Green, J.; Levine, J.; Lombardo, J.; Hong, T. *J Clin Microbiol* **2006**, *44*, 2609-2611.
5. Brown, R. C.; Hopps, H. C. *Am J Clin Pathol* **1973**, *60*, 234-240.
6. Becerra, S. C.; Roy, D. C.; Sanchez, C. J.; Christy, R. J.; Burmeister, D. M. *BMC Res. Notes*. **2016**, *9*, 216.