FUNDACIÓN UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA CITOHISTOLOGÍA

TRABAJO DE GRADO

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE COLORACIÓN GIMENEZ PARA LA TINCIÓN DE CEPAS DE *Legionella pneumophila*

PRESENTADO POR:

LUISA MURCIA

ANGELY CAMBINDO

MAYRA MARTIN

TUTORA

DRA. MARCELA GÓMEZ

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN 3
2. MARCO TEORICO 4
2.1. Legionella pneumophila 4
2.2. COLORACIÓN DE GRAM 6
2.3. COLORACIÓN GIMENEZ 6
2.4. ESTANDARIZACIÓN DE COLORACIONES 7
3. OBJETIVOS 10
4. MÉTODO Y MATERIALES 11
4.1. Preparación de los colorantes 11
4.2. Cultivo Legionella 11
4.3. Preparación de láminas 11
4.4. Estandarización de coloración 12
4.5. Procedimiento técnico 13
4.6. Evaluación 14
5. RESULTADOS 15
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN 24
7. REFERENCIAS 26

1. INTRODUCCIÓN

Legionella pneumophila es una bacteria Gram negativa que puede contaminar sistemas de conducción de agua en Instituciones hospitalarias y hoteles. Al generarse aerosoles puede llegar a sistema respiratorio de personas comprometidas y causar neumonías graves. Son muchos los reportes de brotes hospitalarios y en la mayoría existe una fuente hídrica de contaminación, esto llevo a nivel mundial a crear e implementar diferentes normativas que proporcionan pautas para contener el crecimiento y desarrollo del patógeno con el propósito de evitar brotes a nivel comunitario y hospitalario [1].

En Colombia, desde el año 2015 existe la Guía Técnica Colombiana GTC 257:2015 "Guía para la Prevención y Control de la Proliferación y diseminación de Legionella en instalaciones". La norma presenta criterios y acciones necesarias que ayudaran a la prevención y control de la multiplicación del patógeno, teniendo en cuenta ciertas instalaciones y equipos. La norma no determina los límites de crecimiento bacteriano para *L. pneumophila*; sin embargo, dictamina y estipula medidas preventivas para diferentes sistemas de agua y tipos de instalación. En esta norma tampoco se determinan las acciones a seguir cuando se presenten casos de Legionelosis, pues esto les compete a las autoridades sanitarias[2].

El grupo de investigadores del Instituto de Ciencias Básicas de la FUCS gestionaron un proyecto para la recuperación de *Legionella pneumophila* de sistemas de agua para la Convocatoria de Investigación de la FUCS en 2020. Entre los protocolos planteados esta la utilización de una coloración apropiada para ver la bacteria, ya que su tinción con Gram es pobre.

En este trabajo se realizó la estandarización de la coloración de Giménez para la tinción de *Legionela pnumophila* en muestras de agua. El trabajo sin resultados fue aceptado para presentación oral en el VI Encuentro Nacional de Semilleros de Investigación de la FUCS.

2. MARCO TEORICO

En 1976 se produjo un brote de neumonía severa de etiología desconocida entre los asistentes a una convención de legionarios excombatientes americanos en el hotel Bellevue-Stratford de Filadelfia (*American Legion Convention*).La enfermedad afectó a 221 individuos, de los cuales 34 (15%) murieron, un año después determinaron que el agente causal era una bacilo gramnegativo, al cual llamaron *Legionella pneumophila* [3].

2.1. Legionella pneumophila

Legionella pneumophila vive en diferentes entornos naturales, incluidos ríos, lagos y suelos. Es una bacteria termo tolerante, capaz de multiplicarse entre los 20 y 45°C, con un crecimiento óptimo alrededor de 37°C, pero puede sobrevivir entre los 40°C y 60°C, inactivándose por encima de los 70°C [4].

Los bacilos miden de 0,3 a 0,4 μm de ancho y generalmente de 2 a 3 μm de largo. Los lados no son paralelos y los extremos a menudo puntiagudos y no colorea con Gram [3].

Este microorganismo es ubicuo, se encuentra en ambientes acuáticos como arroyos, ríos, estanques, lagos y piscinas termales; así mismo, puede estar presente en suelo húmedo y lodo. Puede sobrevivir durante largos períodos en ambientes húmedos y soporta un rango de pH de 5.0 a 8.5 [5].

Tiene la capacidad de invadir y crecer dentro de huéspedes protozoarios, como las amebas de vida libre asociadas a biopelículas microbianas que recubren las superficies húmedas. Resiste a la cloración y por tanto puede ingresar a los suministros de agua y proliferar en ambientes térmicos como torres de enfriamiento de aire acondicionado, sistemas térmicos de agua caliente, duchas, grifos, spas de hidromasajes, respiradores y ventiladores mecánicos [6], donde estas bacterias se puedan encontrar formando biopelículas [7]. Estos sistemas de agua se caracterizan por manejar aguas a temperaturas altas, agua estancada, exceso de nutrientes debido a la corrosión de las tuberías y falta de desinfectantes químicos, condiciones que promueven el crecimiento de las biopelículas. Cuando estos entornos construidos generan aerosoles contaminados, *Legionella* se libera constantemente por el movimiento del agua y los cambios de presiones dentro del sistema, de esta forma las personas que se encuentran en las inmediaciones se exponen a *Legionella* por inhalación o aspiración de aerosoles contaminados con la bacteria.

Tras la inhalación de estos aerosoles, la bacteria llega al pulmón y es fagocitada por los macrófagos alveolares, dentro de los cuales se replica activamente[8].

Los pacientes infectados con Legionella pueden desarrollar neumonía llamada Enfermedad del Legionario o Legionelosis, o desarrollar una afección más leve parecida a la gripe llamada Fiebre de Pontiac. La Enfermedad del Legionario puede ser fatal en el 3-33 %, con mayor riesgo en los ancianos, los fumadores y los inmunocomprometidos [8].

Un factor de virulencia muy importante de *Legionella* es el Lipopolisacárido (LPS), formado por la cadena específica de antígeno O, la región central y el componente de lípido A. El antígeno O permite la clasificación de serogrupo específico de L. pneumophila. La cadena O y el núcleo constituyen la región de polisacárido del LPS, mientras que el lípido A representa la parte de la molécula que ancla el LPS en la membrana externa [9]. La estructura química de LPS se diferencia de las otras bacterias Gram negativas en que su Lípido A, formado por ácidos grasos ramificados y de cadena larga estructurales y son la razón para la débil actividad endotóxica de la molécula, asociada a la baja afinidad por el receptor CD14 en macrófagos. El lípido A es muy hidrófobo y presenta una cadena específica de antígeno O, que consiste en ácido legionamínico homopolimérico [10]. Este LPS tiene la utilidad adicional de ser empleado como componente del antígeno urinario detectado en las pruebas de diagnóstico [11].

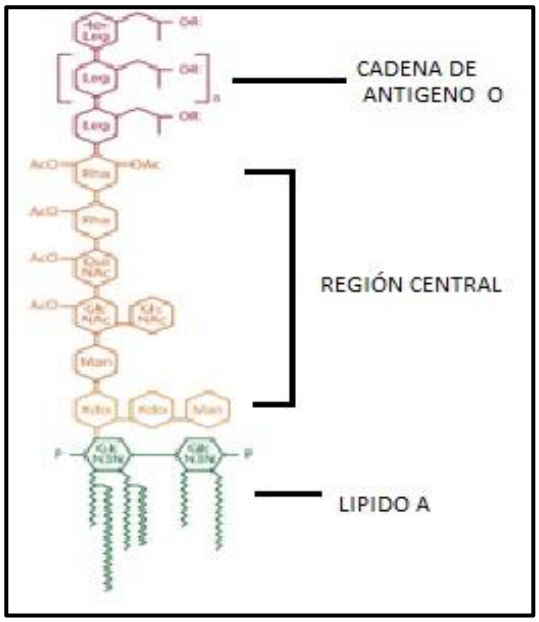


Figura 1. Estructura química del LPS de Legionella pneumophila, Adaptado de (Shevchuk et al., 2011).

2.2. COLORACIÓN DE GRAM

En 1884, Hans Christian Gram, desarrolla una técnica que permite distinguir las bacterias en Gram positivas y Gram negativas. El principio básico de la tinción de Gram implica la capacidad de la pared celular bacteriana para retener el tinte violeta cristal durante el tratamiento con decolorante. Los microorganismos Gram positivos tienen un mayor contenido de peptidoglicanos, mientras que los gramnegativos tienen un mayor contenido de lípidos [12].

Inicialmente, todas las bacterias absorben el tinte cristal violeta; sin embargo, con el uso del decolorante alcohol-acetona, la capa de lípidos de los organismos gramnegativos se disuelve. Con la disolución de la capa lipídica, los gramnegativos pierden la mancha primaria. Por el contrario, el decolorante deshidrata las paredes de las células Gram positivas con el cierre de los poros evitando la difusión del complejo violeta-yodo y, por lo tanto, las bacterias permanecen teñidas. La duración de la decoloración es un paso crítico en la tinción de Gram, ya que la exposición prolongada a un agente decolorante puede eliminar todas las manchas de ambos tipos de bacterias. El paso final en la tinción de Gram es utilizar tinción de fucsina básica para dar un color rosado a las bacterias gramnegativas decoloradas para una identificación más fácil. También se conoce como colorante de contraste. Algunos laboratorios utilizan safranina; sin embargo, la fucsina básica tiñe los organismos gramnegativos más intensamente que la safranina [12].

Entre las limitaciones de la tinción de Gram en tejido se encuentran que algunos microorganismos se tiñen mal con safranina, entre ellos *Legionella pneumophila, Treponema pallidum, Leptospira spp y Bartonella spp* [13].

2.3. COLORACIÓN GIMENEZ

La coloración Giménez es un método que utiliza fuscina carbólica y verde de malaquita como colorante de contraste y fue utilizada por primera vez por Giménez en 1964 para la identificación de *Rickettsias* en cultivo del saco vitelino, con esta tinción las bacterias se observan de color amarillo contra un fondo verde azulado[14].

Greer en 1980 utilizó la tinción de Giménez para la identificación de *Legionella pneumophila* y encontró que era exitoso en cortes de tejido congelados y frotis de tejido pulmonar fresco o fijado con formalina de pacientes que habían confirmado la enfermedad del legionario. Con el procedimiento de Giménez, la bacteria se tiñó de rojo brillante sobre un fondo azul verdoso. Los procedimientos de Gram de tejidos también tiñeron L. pneumophila en cortes congelados y frotis, pero la reacción de

tinción fue débil y estas tinciones no fueron ni tan sensibles ni consistentes como el procedimiento de Giménez [15].

La técnica fue implementada en 1983 por Warren y Marshall para la identificación de bacilos curvos no identificados en biopsias gástricas en pacientes que asistieron al servicio de Gastroenterología por presentar síntomas dispépticos. En el estudio encontraron que la sensibilidad de la tinción de *Giménez* como método de diagnóstico fue de un 97.7% y la especificidad del 85.7% comparado con el cultivo [16].

En 1987, McMullen y col. utilizaron la coloración de Giménez para la identificación histológica de *Campylobacter pyloridis* en mucosa antral gástrica. Se determinó la concordancia de la coloración de Giménez, Gram y cultivo. Concluyendo que la coloración de Giménez fue rápida, económica y confiable en la detección de *Campylobacter sp* en cortes de parafina [17].

En 2000, Gómez y col. determinaron una alta concordancia entre las coloraciones de Giménez y H&E en el diagnóstico de *Helicobacter pylori* en muestras de biopsia. Este trabajo fue realizado en el Hospital Universitario de San José de Popayán [18].

En 2001, Bruneval y col. detectaron con la coloración de Giménez a *Bartonella quintana* y *Coxiella burnetti* en dos casos de endocarditis con hemocultivo negativo y pruebas serológicas positivas [19].

2.4. ESTANDARIZACIÓN DE COLORACIONES

Se denomina estandarización al proceso de unificación de características en un procedimiento. El termino estandarización proviene del término standard, que se refiere a un modo o método establecido, aceptado y normalmente seguido para realizar determinado tipo de actividades o funciones. El término de estandarización implica seguir el proceso standard a través del cual se tiene que actuar o proceder. Al mismo tiempo, esta idea supone la de cumplir con reglas que, si bien en ciertos casos pueden estar implícitas, en la mayoría de las oportunidades son reglas explícitas y de importante cumplimiento a fin de que se obtengan los resultados esperados y aprobados para la actividad en cuestión [20].

El MinSalud y el Instituto Nacional de Salud de Colombia presentan en su plan de Gestión de Calidad de los Laboratorios de Salud Pública los lineamientos técnicos para la estandarización y validación de métodos de ensayo. Los lineamientos están dirigidos a los laboratorios que presentan la necesidad de estandarizar y validar

métodos de ensayo, pero que por diversas condiciones están apenas en proceso de implementación de los métodos de ensayo o que con un sistema medianamente implementado, aún están en condiciones de participar en ensayos interlaboratorios [21]. La estandarización de un método analítico se define como la demostración, mediante evidencia objetiva, es decir mediante resultados de análisis, que un método se comporta de conformidad con los requerimientos específicos de un laboratorio o entidad. Actualmente, dada la gran oferta de métodos de ensayo disponibles en el mercado es preciso que las personas a cargo de los laboratorios tengan claridad acerca de los factores que se deben tener en cuenta en el momento de seleccionar los ensayos que se realizan en el laboratorio.

Los tintes se utilizan para resaltar estructuras en muestras clínicas, a menudo cuando se ve con la ayuda de diferentes microscopios. Las tinciones tienen diferentes afinidades por diferentes organismos y se utilizan para diferenciar tipos de organismos o para ver partes de organismos. La tinción implica la preparación de la muestra en portaobjetos, la fijación (que tiene como objetivo preservar la forma de la célula), la tinción con tintes y la observación bajo el microscopio. A continuación se mencionan los criterios más relevantes al momento de seleccionar un método de coloración no rutinario, como lo es la coloración de Giménez:

Información técnica / limitaciones: La duración de cada paso puede variar según la concentración y la formulación de las soluciones de tinción y otros reactivos. Se recomienda seguir las instrucciones del fabricante siempre que sea posible. Nosotros nos basamos en los diferentes artículos para la preparación y uso de los colorantes.

Paso de enjuague: No se recomienda el uso de agua del grifo al hacer los frotis o al realizar los pasos de enjuague en algunos protocolos de tinción, por ejemplo, en el protocolo de Ziehl-Neelsen, se ha encontrado *Mycobacterium gordonae* en el agua del grifo y puede interferir con la evaluación precisa de la muestra para ser coloreado. Se recomienda agua desionizada o destilada. Nosotros usamos agua destilada estéril, ya que *Legionella pneumophila* puede estar presente en agua de grifo. El enjuague excesivo entre los pasos también podría causar un error en un procedimiento de tinción.

Paso de decoloración: Muchos laboratorios no se adhieren a un tiempo de decoloración fijo para los protocolos de tinción, por lo que los resultados pueden variar. En algunos laboratorios, se enseña al personal de laboratorio a añadir gota a gota el reactivo decolorante hasta que se aclare. Sin embargo, es aconsejable seguir las instrucciones del fabricante al realizar la tinción o un método validado internamente. Nosotros encontramos protocolos con y sin decoloración, así que entre los criterios se probaron las dos opciones.

Dificultades para interpretar los resultados de la tinción: La técnica de tinción es un factor que afecta los resultados. Esto puede deberse a diferencias en la aplicación de los pasos en los protocolos que podrían justificar un análisis si persisten los problemas de interpretación. La estandarización de los protocolos minimizará la variación en los resultados. La coloración de Giménez no diferencia grupos de bacterias, así que nosotros buscaremos el protocolo que permita la mejor visualización de *Legionella pneumophila*.

Otros problemas que pueden afectar los resultados son: Cuando los cultivos no se han mezclado lo suficiente como para romper grupos de células, el frotis resultante puede ser difícil de leer porque las células individuales no son discernibles. El tipo y la calidad de la muestra / frotis. Los frotis que son demasiado gruesos no serán legibles y aquellos que son demasiado delgados pueden resultar en falsos negativos o resultar en la necesidad de repetir el procedimiento. Se trabajó la coloración sobre muestras líquidas.

Control de calidad: Muchas de las tinciones que se describen en el manual Estándar del Reino Unido para la Investigación de Microbiología (SMI del Reino Unido) están disponibles comercialmente y listas para usar. Recomiendan a los usuarios asegurarse de que los tintes preparados comercialmente se hayan sometido a un estricto control de calidad. Cuando se utilizan tintes comerciales, es importante mantener registros de los números de lote de los tintes y las fechas en que se utilizaron con fines de control de calidad. Las tinciones preparadas o diluidas en los laboratorios deben controlarse para garantizar que no haya contaminación por organismos ambientales. Deben usarse portaobjetos de control positivo y negativo cada vez que se realice el procedimiento de tinción. Si una tinción no se usa con frecuencia, es aconsejable ejecutar controles cada vez que se realiza el procedimiento de tinción en un organismo desconocido. Los portaobjetos positivos y negativos deben prepararse utilizando cepas de referencia conocidas [22]. Nosotros no utilizamos controles positivos o negativos, ya que se trabajó con una cepa ATCC de *Legionella pneumophila* y porque tanto bacterias gram positivas como gram negativas se ven del mismo color con la coloración de Giménez.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Estandarizar la coloración de Giménez para *Legionella pneumophila* en muestras de agua.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Seleccionar el proceso de fijación de la muestra
- Determinar si se requiere el paso de decoloración
- Establecer el tiempo óptimo para la solución de trabajo de carbol fuscina.
- Determinar el tiempo óptimo para el colorante verde de malaquita
- Realizar evaluación externa de los resultados

4. MÉTODO Y MATERIALES

- Diseño de investigación se realizó un estudio descriptivo.
- Tipo y estrategia de muestreo **No aplica.**
- Tamaño de la muestra **216 fotos.**

Se utilizó una cepa de *Legionella pneumophila subsp. Pneumophila* NCTC11192 del Laboratorio Liofilchem (equivalente a la cepa ATCC 33152).

4.1. Preparación de los colorantes

Se utilizó Carbol fuscina ZN comercial y se prepararon los colorantes y buffer de la siguiente forma:

Fosfato de Na dibásico 0,1M: Disolver 14,1 gr de fosfato sódico dibásico en 1000 ml de agua destilada.

Fosfato de Na monobásico 0,1M: Disolver 1,37 gr de Fosfato sódico monobásico en 100ml de agua destilada

Buffer pH 7.5: Fosfato de Na monobásico 35ml 0,1M y Fosfato de sodio dibásico 155ml. Comprobar pH=7.5

Solución Carbol Fuscina de trabajo: Carbol fuscina ZN comercial 4ml y 10 ml de buffer. Filtrar antes de usar. Desechar la solución que no se utilice.

Ácido acético 0,1%: Ácido acético 0,1ml en 99,9ml agua destilada

Verde malaquita: Disolver 0,8 gr de verde de malaquita en 100ml de agua destilada.

4.2. Cultivo Legionella

La cepa comercial de *Legionella pneumophila subsp. Pneumophila* NCTC11192 se cultivó en el medio BCYE, se incubo a 37°C durante 3 días.

4.3. Preparación de láminas

Se realizó una dilución de *Legionella pneumophila* a una concentración de $1,5x10^6$ UFC/ml en caldo tioglicolato por turbimetría y posteriormente se llevó a una concentración de $1,5x10^3$

Se marcaron las láminas con su respectiva enumeración y se delimito con un círculo el sitio donde se aplicaría posteriormente la concentración de la bacteria, esto se realizó con un lápiz de cera.

Se utilizaron 10 μl de la dilución $1,5x10^3$ UFC /ml con asa calibrada en cada lámina.

4.4. Estandarización de coloración

Diferentes procedimientos de la coloración de Giménez se encontraron durante la revisión bibliográfica:

Ref. McMullen [17]

Carbol Fucsina ZN 4ml		Fija láminas al calor 4 min y lavar
Fosfato de Na monobásico 3,5ml 0,1M		
Fosfato de Na dibásico 15,5 ml 0,1M		
Verde de malaquita (0,8g/ 100ml H20)	**Cubrir 15-20 seg y lavar**	
Bacterias amarillas fondo verde	**bacterias magenta fondo azul**	

Giménez [14]

Carbol Fucsina ZN 4ml	Láminas se secan al aire 1-2 minutos y lavar	Decoloración con ácido acético 0,1% 30 ser
Fosfato de Na monobásico 3,5ml 0,1M		
Fosfato de Na dibásico 15,5 ml 0,1M		
Verde de malaquita (0,8g/ 100ml H20)	**6-9 segundos**	
Bacterias amarillas fondo verde	**bacterias magenta fondo azul**	

Vanrompay [23]

Carbol Fucsina ZN 4ml	Fijación metanol 30 min. Colorante 30 min lavar	1 min
Fosfato de Na monobásico 3,5ml 0,1M		
Fosfato de Na dibásico 15,5 ml 0,1M		
Verde de malaquita (0,8g/ 100ml H20)	**al 3% 30 seg y lavar**	
Bacterias amarillas fondo verde	**bacterias magenta fondo azul**	

Basados en estos procedimientos, se eligieron cuatro pasos para la estandarización:

1. Método de fijación de las bacterias: evaluamos secado al aire, al calor bajo mechero y fijación con metanol

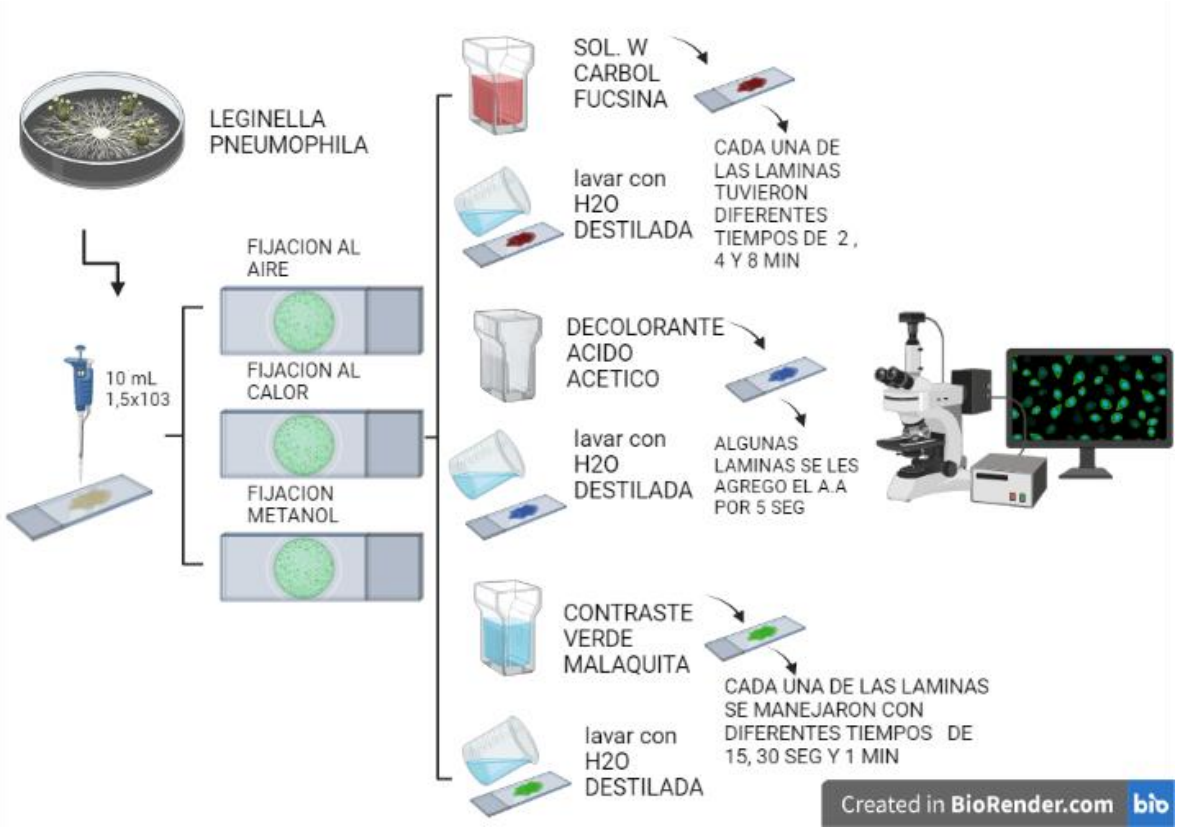
2. El colorante Carbol fuscina se aplicó por 2, 4 y 8 minutos.
3. Se probó con y sin decoloración con ácido acético
4. Coloración de contraste con Verde de malaquita durante 15, 30 y 60 segundos

4.5. Procedimiento técnico

- **Fijación al aire**
    1. Se dejan las láminas secar al aire
    2. Aplicar carbol fuscina
    3. Lavar con agua destilada
    4. Decolorar con Ac. Acético
    5. Lavar con agua destilada
    6. Contrastar con verde de malaquita
    7. Lavar con agua destilada
    8. Dejar secar al aire
    9. Montaje de las láminas con resina

- **Fijación al calor**
    1. Se fijan las láminas flameadas con mechero
    2. Aplicar carbol fuscina
    3. Lavar con agua destilada
    4. Decolorar con Ac. Acético
    5. Lavar con agua destilada
    6. Contrastar con verde de malaquita
    7. Lavar con agua destilada
    8. Dejar secar al aire
    9. Montaje de las láminas con resina

- **Fijación con metanol**
    1. Se aplica metanol
    2. Aplicar carbol fuscina
    3. Lavar con agua destilada
    4. Decolorar con Ac. Acético
    5. Lavar con agua destilada
    6. Contrastar con verde de malaquita
    7. Lavar con agua destilada
    8. Dejar secar al aire
    9. Montaje de las láminas con resina



4.6. Evaluación

Se realizó registro fotográfico, tomando dos imágenes por lámina. Las fotos fueron clasificadas y se realizó una selección inicial por parte del profesor tutor.

La tabla generada fue evaluada por cada estudiante y se seleccionó una foto por protocolo de fijación, de acuerdo al fondo, forma de los bacilos, contraste, en cual imagen se tiñó mejor el bacilo, los bacilos debían estar uniformemente distribuidos, sin acúmulos y sin suciedad.

Se creó una encuesta en Google forms. La encuesta presenta 3 fotos y 3 preguntas sobre estas. Los encuestados no conocerán el tipo de protocolo realizado.

Se envió a profesores y estudiantes de Citohistología de la FUCS, para determinar cuál era la mejor foto.

De acuerdo a los resultados de la encuesta seleccionamos el mejor protocolo para aplicar.

5. RESULTADOS

Se realizo la preparación de los colorantes y buffers, como se presenta en la figura 2.

Figura 2. Colorantes, reactivos y buffers preparados para la coloración

La cepa de *Legionella pneumophilla* crecio en agar BCYE y es presentado en la figura 3.

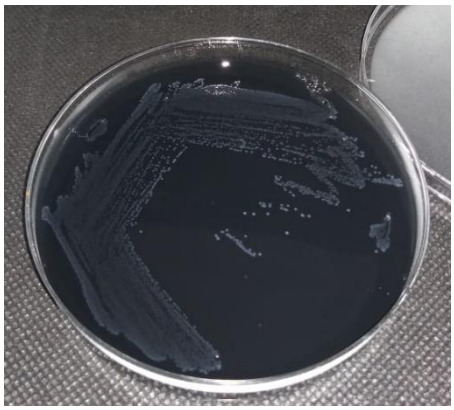


Figura 3. Cultivo Legionella

Cada procedimiento de fijación de bacterias se realizó en días diferentes, uno de estos es mostrado en figura 4

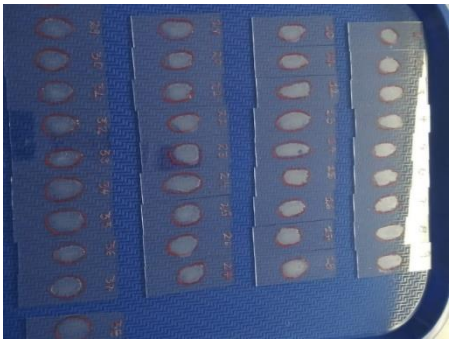


Figura 4. Láminas fijadas por secado al aire

Entre los criterios evaluados por tiempo fueron el colorante de Carbol fuscina (Figura 5), la decoloración con ácido acético y la coloración de contraste con verde de malaquita (Figuras 6)

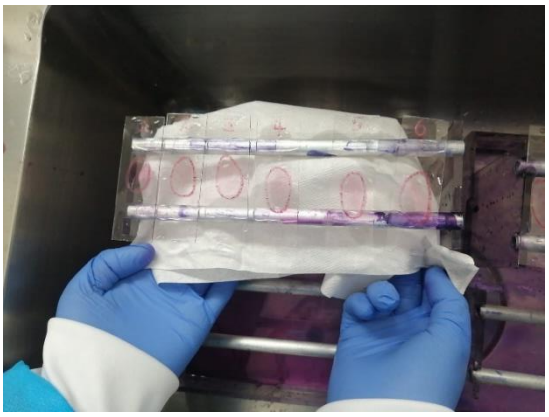


Figura 5. Láminas coloreadas con solución de trabajo de Carbol fuscina

Figura 6. Láminas al terminar coloración de contraste con Verde de Malaquita

Se realizó coloración de Gram para ver la morfología pleomórfica de los bacilos gram negativos de *Legionella pneumophila (Figura 7)*

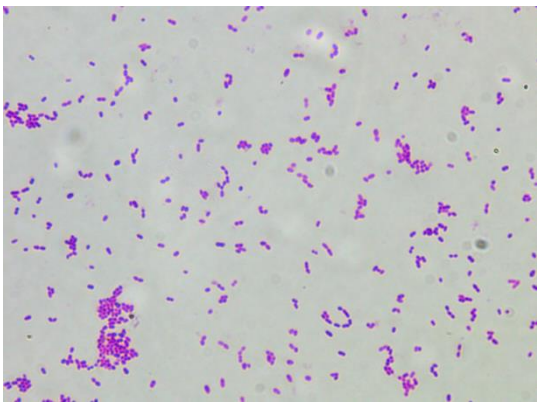
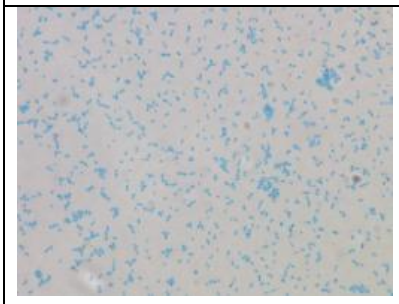
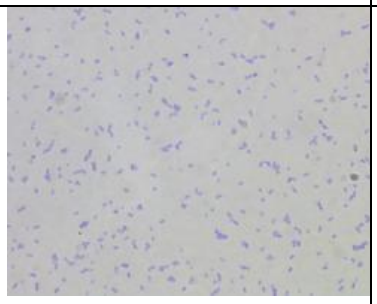
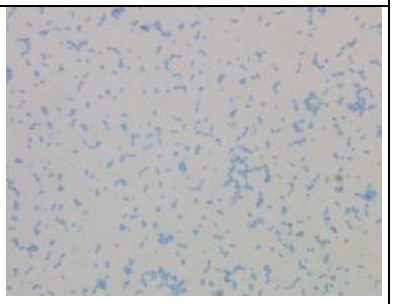
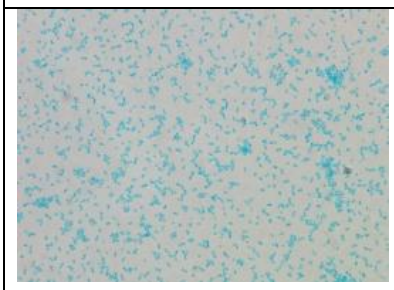
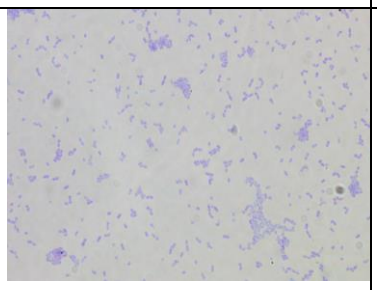
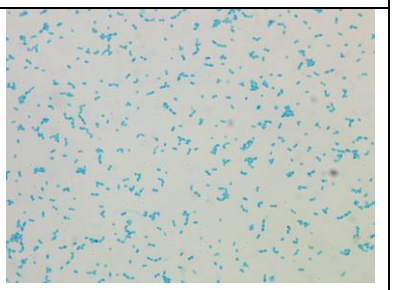
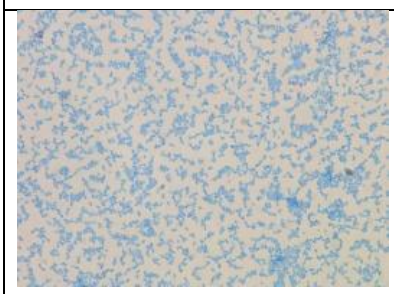
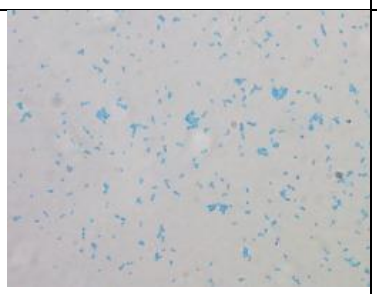
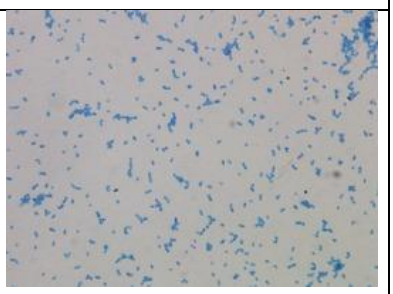


Figura 7. Legionella pneumophila bajo coloración de Gram

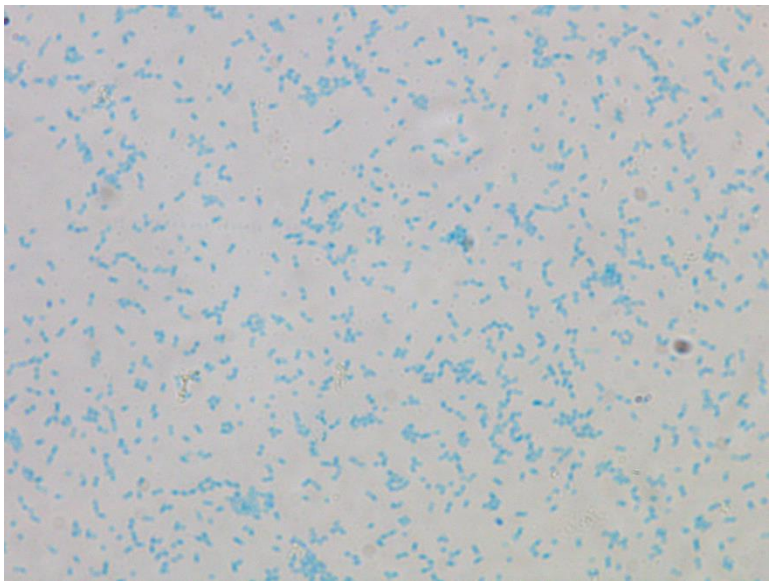
Se realizó lámina por duplicado de cada variable evaluada, se colorearon 36 láminas por proceso, obteniendo un total de 108 láminas y 216 fotos (Anexo 1)

Se buscaron bacterias de color magenta sobre un fondo azul verdoso de acuerdo a la literatura.

Las imágenes seleccionadas por la tutora fueron las siguientes:

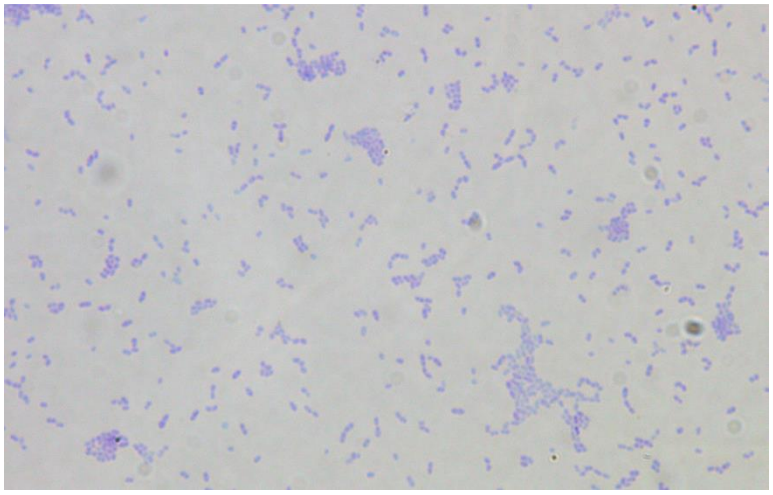
FIJACIÓN AL AIRE	FIJACIÓN AL CALOR	FIJACIÓN METANOL
		
		
		

Las imágenes seleccionadas por las estudiantes y los criterios son presentados a continuación:



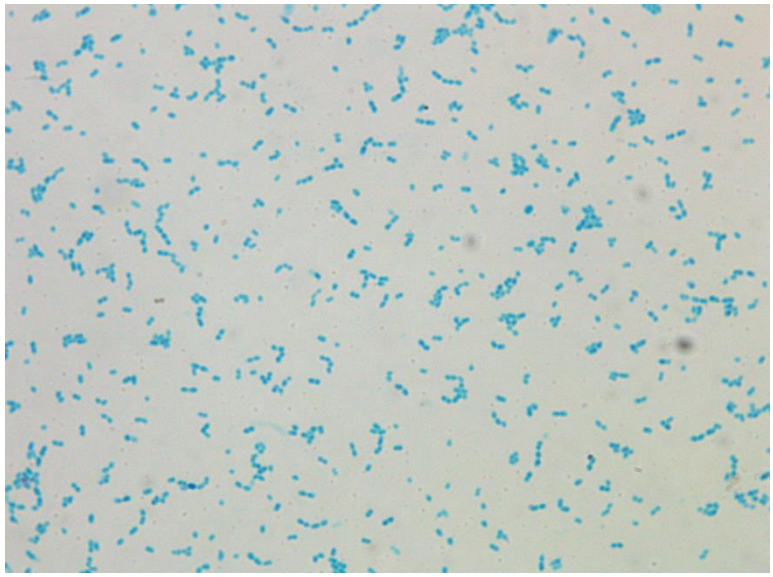
SECADO AL AIRE

Criterios de selección:
Tiene un mejor contraste, mejor definición, los bacilos se ven bien distribuidos, se ve llamativa por la intensidad del color



FIJACION AL CALOR

Criterios de selección:
Resalta el color de los bacilos y se ve más clara.



FIJACIÓN METANOL

Criterios de selección:
Resalta mucho por la intensidad del color, se aprecia el contraste por la calidad de la definición y se aprecia claramente la forma de los bacilos

Presentamos la encuesta de tres preguntas enviada por correo electrónico a todos los estudiantes de la facultad de Citohistología y docentes del programa.

Coloración Giménez para Legionella pneumofila

Reciban un cordial saludo, somos estudiantes de Citohistologia de IV semestre, y queremos que nos colaboren evaluando las siguientes imágenes, en donde se realizo la coloración de Gimenez para la bacteria Legionella, con el fin de que la bacteria tome un color magenta.

Cuál imagen considera que tiene mejor calidad?

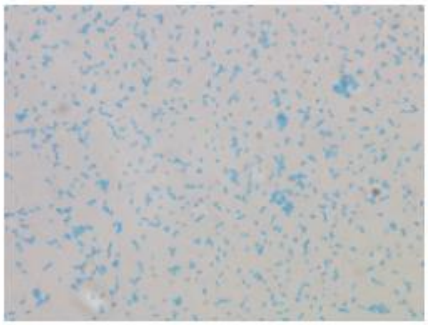


Imagen 1

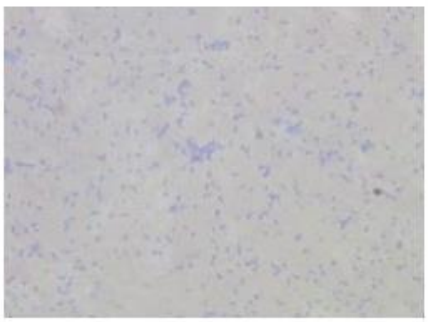


Imagen 2

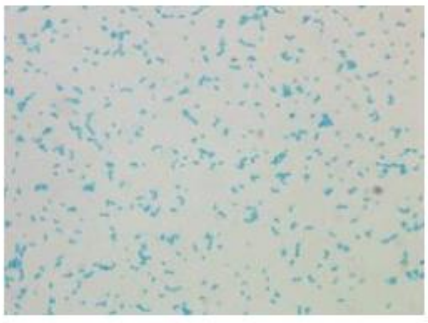


Imagen 3

En cuál de las imágenes se visualiza mejor el bacilo?

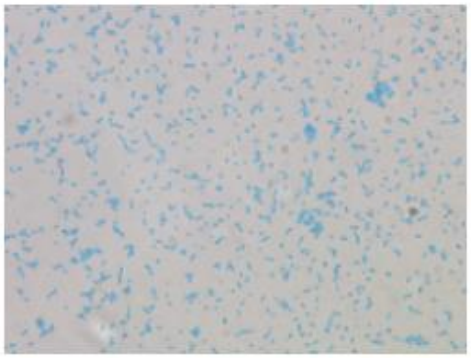


Imagen 1

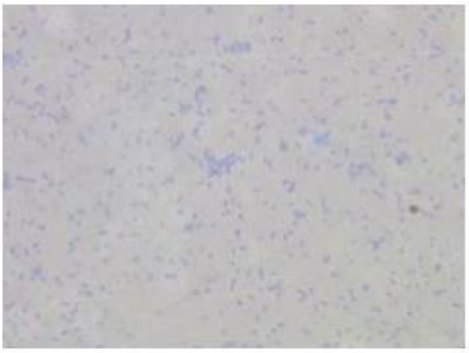


Imagen 2

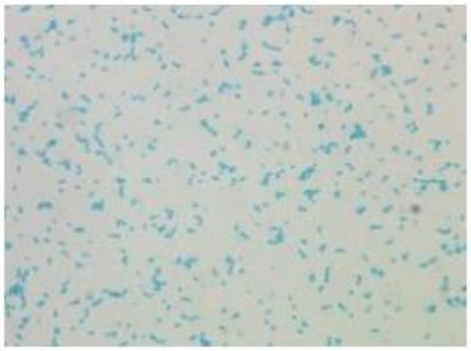


Imagen 3

Cuál de las imágenes considera que tiene mejor contraste?

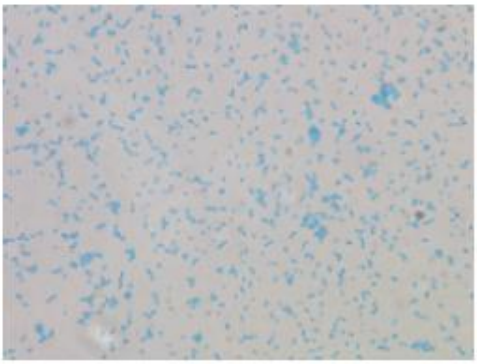


Imagen 1

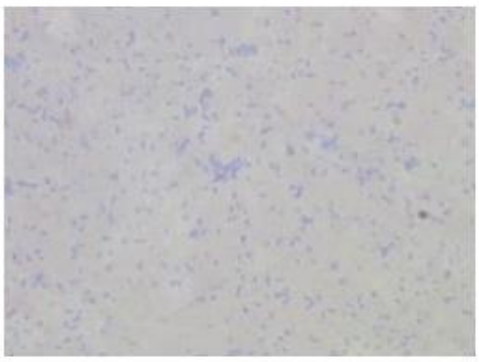


Imagen 2

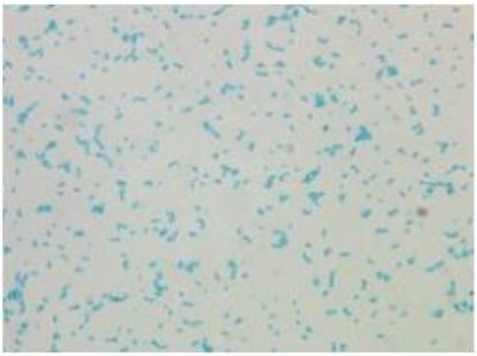


Imagen 3

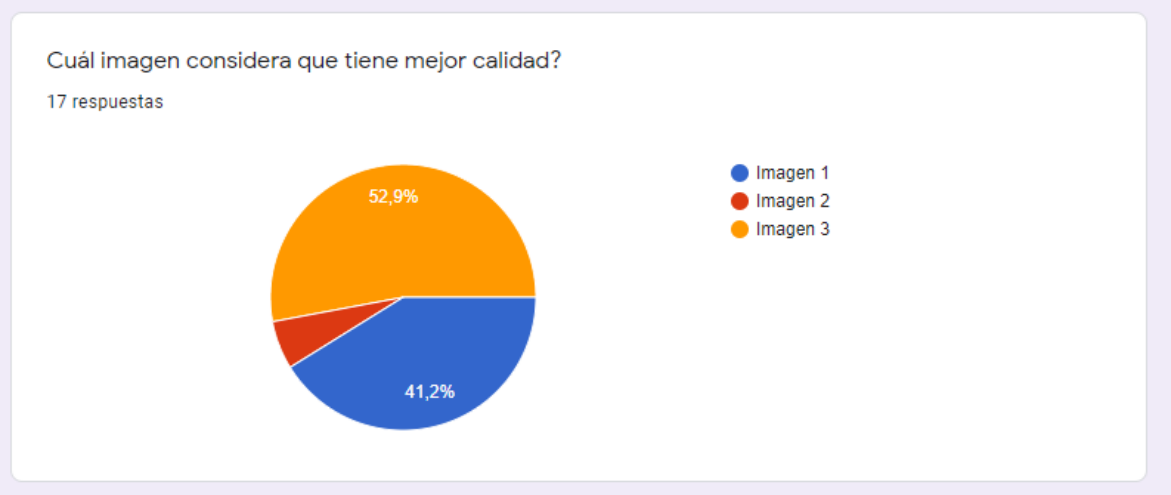
Nos gustaría saber tu opinión de las imágenes evaluadas.

Tu respuesta

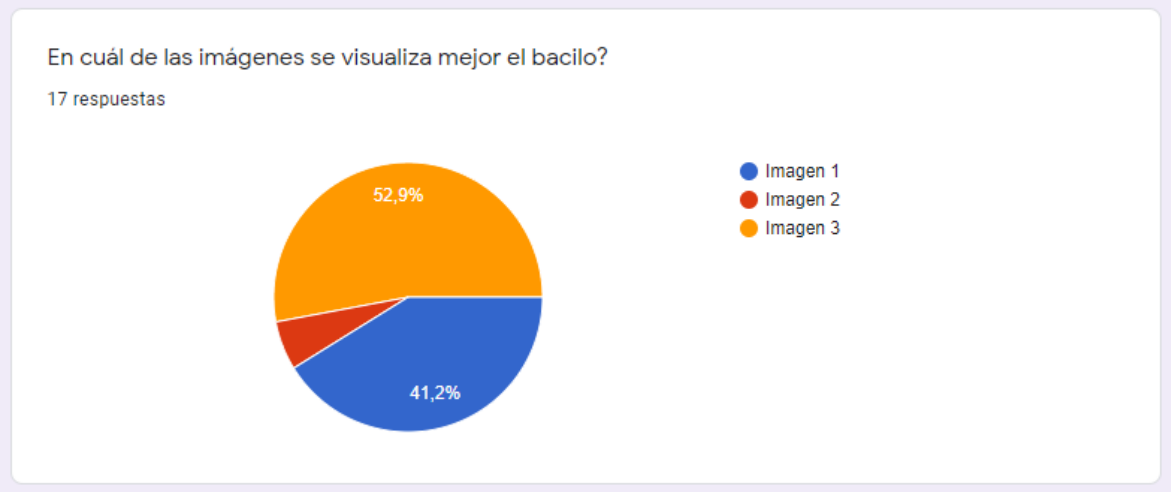
Los resultados de la encuesta fueron los siguientes:

La encuesta fue enviada a 56 personas de las cuales obtuvimos respuesta de 17.

- **Pregunta 1**

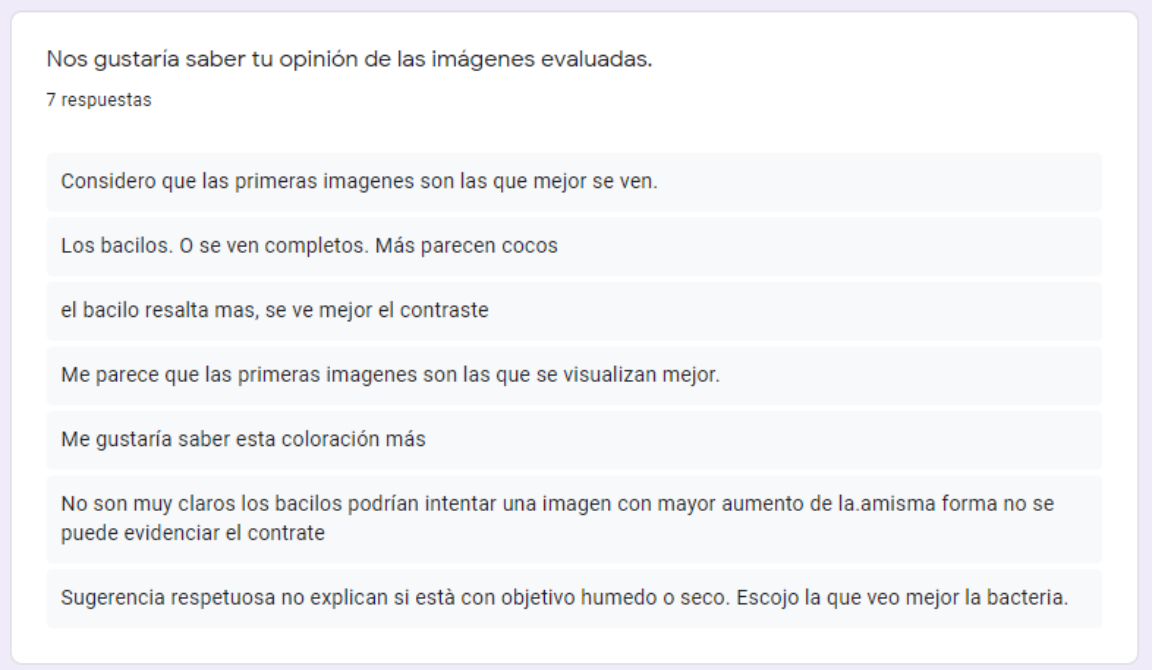


- **Pregunta 2**



- **Pregunta 3**

- **Observaciones**



6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Al realizar la estandarización de la técnica de coloración de Giménez establecimos que se debían tener en cuenta muchos criterios y que podíamos involucrarnos en todos los pasos del proceso: búsqueda de información, selección de protocolos, preparación de reactivos, planeación del proceso, aplicación de la coloración, selección del material, creación de las encuestas y redacción del escrito.

La técnica de coloración de Giménez fue empleada para visualizar a *Legionella pneumophila* dentro de trofozoítos de amebas. El estudio determinó que la coloración era más sencilla y ofrecía mejores resultados en comparación con Gram e Inmunofluorescencia. Con la tinción de Giménez se logró el mejor color y contraste, permitiendo distinguir claramente la bacteria en el citoplasma de los trofozoítos. Los investigadores recomiendan la coloración por su adecuada sensibilidad y porque solo se necesitaban 10 minutos para finalizar la operación. Las otras técnicas requirieron el uso de reactivos costosos, consumían mucho tiempo e implican procedimientos de tinción complejos [24]. En nuestro caso identificamos las siguientes ventajas y desventajas de la coloración de Giménez:

VENTAJAS

- El procedimiento técnico de las láminas fijadas con metanol, requiere de menos tiempo en comparación a las láminas fijadas al aire y al calor, obteniendo así unos resultados más óptimos, permitiendo una mejor visualización del bacilo.
- En comparación a la coloración de Gram, el bacilo se ve más detallados con la coloración de Giménez.

DESVENTAJAS

- Las fijaciones al aire y al calor requieren de mucho más tiempo y los resultados no son los esperados.
- No poder contar con controles negativos.

Identificar bacterias en muestras líquidas con bajas concentraciones de bacterias es un problema para los laboratorios. Bruneval y col. lo demuestran al buscar el agente causal de endocarditis en dos pacientes con sintomatología clara de infección bacteriana, pero con hemocultivos negativos. Bajo coloración de Gram no lograron observar microorganismos, pero al aplicar la coloración de Giménez detectaron la presencia de bacilos pleomorficos. Por pruebas serológicas llegaron al diagnóstico de dos bacterias fastidiosas que no tiñen bien con Gram, Bartonella quintana y Coxiella burnetti. Este informe describe la tinción de Giménez, como factible y sensible [19]. Nuestras fotos de coloraciones demostraron la presencia de *Legionella pneumophila* en muestras de agua en una concentración de $1{,}5x10^3$ UFC /ml, es decir 1500 bacterias por ml. El paso siguiente a la estandarización es la validación de la coloración, en la que se determinara el límite de cuantificación, es decir cuántas bacterias son detectables en la coloración de Giménez.

Teniendo en cuenta los resultados de las encuestas, la foto 3, llegamos a que el proceso de coloración que se utilizara en los nuevos trabajos con *Legionella pneumophila* es:

1. Se fijan las láminas con metanol
2. Aplicar carbol fuscina por 4 minutos
3. Lavar con agua destilada
4. Decolorar con Ac. Acético
5. Lavar con agua destilada
6. Contrastar con verde de malaquita por 15 segundos
7. Lavar con agua destilada
8. Dejar secar al aire
9. Montaje de las láminas con resina

Concluimos que la coloración de Giménez es adecuada para visualizar bacterias difíciles, como es el caso de *Legionella pneumophila*, tanto por no colorear como gram negativo, como por presentar una morfología pleomórfica que confunde con cocos.

Finalmente queremos agradecer al Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencias Básicas de la FUCS por permitirnos vincularnos al trabajo, a nuestra tutora Dra. Marcela Gómez por su asesoría constante y al estudiante rotante Sebastián Cufiño de UCMC por su ayuda y guía permanente. Y a todos nuestros compañeros y profesores de Citohistología que nos apoyaron contestando la encuesta.

7. REFERENCIAS

1. Sonza M, Yanguatin J. Legionella pneumophila y su papel en brotes hospitalarios a causa del agua. Revisión Bibliográfica. Published online 2021.

2. INCONTEC. *Guía Técnica Colombiana GTC 257:2015 "Guía Para La Prevención y Control de La Proliferación y Diseminación de Legionella En Instalaciones."*; 2015.

3. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med*. 1977;297(22):1189-1197. doi:10.1056/NEJM197712012972201

4. García-Núñez M. Colonización citopatogenicidad y persistencia de Legionella spp. en agua sanitaria hospitalaria. Published online 2010. http://www.tdx.cat/handle/10803/4544

5. Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M, Messi P. Water ecology of Legionella and protozoan: Environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev*. 2005;11(SUPPL.):355-380. doi:10.1016/S1387-2656(05)11011-4

6. Burillo A, Pedro-Botet ML, Bouza E. Microbiology and Epidemiology of Legionnaire's Disease. *Infect Dis Clin North Am*. 2017;31(1):7-27. doi:10.1016/j.idc.2016.10.002

7. Abu Khweek A, Amer AO. Factors mediating environmental biofilm formation by Legionella pneumophila. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8(FEB):1-10. doi:10.3389/fcimb.2018.00038

8. Systems NA of SE and M (U. S). C on M of L in W. Management of Legionella in water systems. *Consens study Rep*. Published online 2019:1 online resource (1 PDF file (x, 280 pages)). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555109/ NLM Bookshelf Books

9. Shevchuk O, Jäger J, Steinert M. Virulence properties of the Legionella pneumophila cell envelope. *Front Microbiol*. 2011;2(APR):1-12. doi:10.3389/fmicb.2011.00074

10. Petzold M, Thürmer A, Menzel S, Mouton JW, Heuner K, Lück C. A structural comparison of lipopolysaccharide biosynthesis loci of Legionella pneumophila serogroup 1 strains. *BMC Microbiol*. 2013;13:198. doi:10.1186/1471-2180-13-198

11. Lück C, Helbig JH. Characterization of Legionella Lipopolysaccharide. In: Vol 954. ; 2013:381-390. doi:10.1007/978-1-62703-161-5_24

12. Tripathi N, Sapra A. Gram Staining. In: ; 2021.

13. Jimenez G, Vélez A. Tinción de Gram de tejido: alcances y limitaciones. *Med Lab*. 2012;18(11-12):557-573.

14. Giménez DF. Staining Rickettsiae in Yolk-Sac Cultures. *Stain Technol*. 1964;39(3):135-140. doi:10.3109/10520296409061219

15. Greer PW, Chandler FW, Hicklin MD. Rapid demonstration of Legionella pneumophila in unembedded tissue. An adaptation of the Giménez stain. *Am J Clin Pathol*. 1980;73(6):788-790. doi:10.1093/ajcp/73.6.788

16. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet (London, England)*. 1983;1(8336):1273-1275.

17. McMullen L, Walker M, Bain L, Karim Q, Baron J. Histological identification of Campylobacter using Gimenez technique in gastric antral mucosa. *J Clin Pathol*. Published online 1987:464-465.

18. Gomez M, Ceballos A, Restrepo A. Helicobacter pylori en biopsias gástricas en el Hospital UniversitarioSan José de Popayán Cauca. *Rev Fac Cienc Salud Univ Cauca*. 2000;2(1):10-18.

19. Bruneval P, Choucair J, Paraf F, et al. Detection of fastidious bacteria in cardiac valves in cases of blood culture negative endocarditis. *J Clin Pathol*. 2001;54(3):238-240. doi:10.1136/jcp.54.3.238

20. Deficinión ABC. Tu diccionario hecho fácil. Accessed September 15, 2021. https://www.definicionabc.com/general/estandarizacion.php

21. INS, Instituto Nacional de Salud L de SP. *LINEAMIENTOS TÉCNICOS PARA LA ESTANDARIZA*.; 2014.

22. MicrobiologyInvestigations. *UK Standards for Microbiology Investigations. Staining Procedures*.; 2019.

23. Vanrompay D, Ducatelle R, Haesebrouck F. Diagnosis of avian chlamydiosis: specificity of the modified Giménez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1992;39(2):105-112. doi:10.1111/j.1439-0450.1992.tb01144.x

24. Shen J, Jiang Q, Li Q, Chen H, Li Z-H. [Gimenez staining: a rapid method for initial identification of legionella pneumophila in Amoeba trophozoite]. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi = Chinese J Parasitol Parasit Dis*. 2005;23(4):240-242.