

COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN



biopack.com.ar

REF Nº de catálogo: 2000151500

IVD Reactivo de Diagnóstico para Uso in Vitro

Uso previsto:

La Coloración de Ziehl-Neelsen es un tipo de tinción diferencial rápida de las más utilizadas en bacteriología, para la identificación de bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR) como Mycobacterium, incluyendo M. tuberculosis, M. ulcerans, M. leprae y micobacterias no tuberculosas (MNT) y el filo Apicomplexa (coccidios intestinales) como Plasmodium y Toxoplasma.

Aplica para el diagnóstico en muestras clínicas (sangre, orina, fluidos corporales y/o preparaciones histológicas).

En los casos de una sospecha de tuberculosis son necesarios procesos de cultivo y tinción. Las micobacterias se tiñen con el método de Ziehl Neelsen, en particular la Mycobacterium Tuberculosis es un bacilo ácido alcohol resistente, de extremos redondeados, se tinte de forma irregular. Su aspecto a veces es algo incurvado y tiene una longitud de 1 a 4 micrones, y un ancho de 0.3 a 0.6 micrones. Su ácido resistencia demostrable por la tinción de Ziehl Neelsen, se debe ante todo a los componentes lipídicos de su pared celular.

Principio:

La detección de bacilos acidorresistentes (BAAR) en frotis, extendidos, muestras de tejido, etc, examinados microscópicamente puede proporcionar la evidencia bacteriológica inicial de la presencia de micobacterias en una muestra clínica.

La pared celular de las micobacterias contiene altas concentraciones de lípidos, lo que las hace hidrófobas e impermeables a tinciones habituales como la de Gram.

El método de tinción de Ziehl-Neelsen, fue descrito por primera vez por dos médicos alemanes: Franz Ziehl, un bacteriólogo, y Friedrich Neelsen, un patólogo.

Consta de tres pasos básicos:

1. Aplicación del colorante primario Fucsina básica
2. Decoloración rápida con alcohol-acido.
3. Contratinción con azul de metileno.

Básicamente el colorante se une al ácido micónico de la pared celular micobacteriana. La coloración clásica de Ziehl-Nielsen requiere calentamiento para que el colorante atraviese la pared bacteriana que contiene ceras. Al suspender el calentamiento y enfriar, provoca la reconstitución de los ácidos grasos de modo que el colorante ya no puede salir de las bacterias.

Por otro lado, el calentamiento aumenta la energía cinética de las moléculas del colorante lo cual también facilita su entrada a las bacterias.

En el caso de Tinción de preparados histológicos, puede realizarse el mismo procedimiento, evitando el calentamiento de la muestra, pero en ese caso duplicando el tiempo de incubación en Fucsina básica.

Tras la tinción primaria, se aplica una solución decolorante ácida. Esto elimina el colorante rojo de las células de fondo, las fibras tisulares y cualquier microorganismo presente en el frotis.

Las bacterias que resisten la decoloración y retienen el colorante se denominan bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), son de color rojo.

Las bacterias que no resisten la decoloración se verán de color azul ya que se utiliza azul de metileno como tinción de contraste.

Los productos COLORANTES BACTERIOLÓGICOS DE BIOPACK ® (COLORACIÓN DE GRAM [MODIFICACIÓN DE HUCKER] Y COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN) son colorantes de utilidad en el laboratorio microbiológico clínico. Estas tinciones funcionalmente cuentan con 4 etapas: tinción primaria, mordiente, decoloración y tinción secundaria, esta última también llamada coloración de contraste o contratinción.

1) La tinción primaria es generalmente un colorante básico con carga positiva. Los colorantes primarios comunes incluyen Fucsina básica, violeta cristal, azul de metileno y safranina. Estos colorantes primarios van a marcar no solamente el microorganismo blanco, sino también muchos microorganismos no blancos y material de fondo. Los colorantes son compuestos orgánicos naturales o artificiales compuestos por tres componentes básicos: una anilla de benceno o aromático, un cromóforo, y grupos auxocrómicos. La mayoría de los colorantes biológicos son derivados del alquitrán y su estructura fundamental es el anillo de benceno. Los grupos atómicos específicos conocidos como cromóforos se asocian con el color. Estos radicales químicos absorben la luz de diferentes longitudes de onda ya que actúan como primas químicas. El anillo de benceno con los radicales cromóforos se considera el cromógeno y es coloreado, pero en sí mismo no es un colorante ya que no puede unirse a los microorganismos o tejidos. Los grupos auxocrómicos proveen las propiedades de combinación del colorante formando uniones salinas electrostáticas con radicales ionizables sobre las proteínas, glicoproteínas y lipoproteínas de componentes de los tejidos o de las membranas de los gérmenes. Este proceso puede ocurrir directamente o a través de la acción quelante del mordiente.

Los colorantes son anfotéricos, es decir, pueden actuar como ácido o como base de acuerdo a si la mayor proporción del colorante es aniónica o catiónica.

Los colorantes básicos marcan estructuras que son ácidas, y los colorantes ácidos reaccionan con sustancias básicas.

2) Un mordiente es un proceso químico o físico que fija el colorante primario al microorganismo blanco. Los mordientes comunes incluyen complejos iodados como se usa en la coloración de Gram, y calor o fenol usados en la marcación rápida ácida.

3) Un decolorante es una sustancia química que extrae o elimina cualquier tinción inespecífica o de unión inestable con el microorganismo blanco. Luego del paso de la decoloración, los microorganismos blanco son el color de la tinción primaria, y los organismos no blancos y el fondo deben estar desprovistos de color. Los decolorantes comunes incluyen acetona o alcohol para la coloración de Gram, y una mezcla de ácido y alcohol para la marcación ácida rápida.

4) La marcación secundaria o contramarcación es un método para proveer color a los microorganismos no blanco. En general, la contramarcación se haya dentro de una parte diferente del espectro visible de marcación primaria. Algunas contramarcaciones son aditivas a las marcaciones primarias. Por ejemplo, la contramarcación roja de la tinción Gram es aditiva a la marcación primaria azul para producir un microorganismo blanco de color púrpura. En otros casos la contramarcación no marca en absoluto al microorganismo blanco. Por ejemplo, la contramarcación azul de la marcación ácida rápida no penetra en el microbio blanco (Mycobacteria) para afectar su color rojo. Por lo tanto, el objetivo es rojo y el fondo es azul.

Reactivos y presentaciones:

Solución de Fucsina básica, envase x 100 mL y repuesto x 1000 mL

Solución de Azul de Metileno, envase x 100 mL y repuesto x 1000 mL

Solución Decolorante, envase x 100 mL y repuesto x 1000 mL

Condiciones adecuadas de almacenamiento:

Almacenar a temperatura ambiente entre 15°C y 30°C. Proteger de la luz.

Conservar bajo llave en lugar fresco y bien aireado lejos del alcance de los niños. Mantener el recipiente bien cerrado y alejado de fuentes de ignición.

Precauciones, cuidados especiales y riesgos:

Tóxicos si se inhala o ingiere. Inflamable. Evitar contacto con la piel. Si ocurriera la inhalación, ingestión o contacto con la piel en forma accidental, consultar al médico. No fumar durante su uso. Solamente para uso diagnóstico in vitro.

Orientaciones sobre los cuidados con la muestra biológica:

Muestra de sangre. Es importante que la muestra de sangre sea recogida en forma aseptica, limpiando la piel con alcohol al 80-95% y luego aplicando una solución de ioduro al 2% en forma concéntrica en el sitio de venopuntura. Como la antisepsia nunca se da en forma instantánea, el desinfectante debe permanecer en contacto con la piel por lo menos durante 1 minuto. Se sugiere extraer 20 mL de sangre en adultos y 1 a 5 mL en niños. En condiciones óptimas, la sangre debe ser inoculada directamente en el medio de cultivo al lado del paciente mediante una jeringa o aguja. Cuando esto no fuera posible, la sangre debe ser transportada al laboratorio en tubo estéril conteniendo polianetolsulfonato sódico (SPS) y luego inoculada en el medio de cultivo.

Cateteres intravasculares: los catéteres intravasculares son una fuente importante de bacteriemia y fungemia. Por lo tanto, la identificación microbiológica de catéteres es importante para establecer la relación con infección con gérmenes Gram positivos y Gram negativos. Se debe remitir al laboratorio 5 cm de la porción distal del catéter. La muestra debe ser transportada al laboratorio en forma inmediata para prevenir la desecación.

Heridas, tejidos, abscesos, muestra de drenaje. El análisis microbiológico de estas muestras muchas veces es la única información acerca de la etiología de un proceso infeccioso. Toda vez que se pueda es preferible tomar muestra del tejido o del líquido de la lesión a realizar hisopados. Cuando sólo puedan obtenerse muestras de hisopados. Estos deben abarcar todas las superficies sospechosas.

Orina. Como la orina es un excelente medio de crecimiento para los microorganismos, las muestras de orina deben ser cultivadas dentro de la hora de recolección de la muestra a menos que sean refrigeradas. En paciente de sexo femenino y en hombres con incontinencia es preferible utilizar el chorro medio de orina como muestra. Ante la sospecha de infección por gérmenes anaeróbicos es preferible utilizar la punción suprapubica ya que la uretra es colonizada normalmente por gérmenes anaeróbicos que podrían interferir con el resultado.

El laboratorio que recibe la muestra debe anotar al momento de recepción para identificar el tiempo de tránsito de la muestra. Las muestras que han estado demasiado tiempo en tránsito pueden no ser útiles para el análisis microbiológico. Las muestras deben ser transportadas en recipientes adecuados. El personal que toma o transporta la muestra debe estar informado acerca del riesgo que contraer una enfermedad infecciosa que es inherente a esta actividad.

Consideraciones previas al uso:

- Para muestras de sangre, realizar el extendido y fijar con calor previo a comenzar con el procedimiento de tinción.
- Para muestras citológicas por punción aguja fina, secreciones o exudados, proceder a realizar los extendidos, fijar y luego comenzar con procedimiento de tinción.
- Para muestras de tejido fijado e incluido en parafina, desparafinar e hidratar los cortes histológicos; luego comenzar con el procedimiento de tinción.
- Tenga en cuenta que la calidad del extendido celular o el corte histológico (concentración celular demasiado alta o demasiado baja) afectará los resultados de la tinción de Gram.
- La Coloración de Ziehl-Neelsen requiere el calentamiento de la muestra con Fucsina básica, como parte de la metodología de tinción. En caso de no poder realizar esa maniobra recomendamos, incubar con solución de Fucsina básica de 20 a 30 minutos, y continuar con el resto de las etapas del método.
- Para realizar el calentamiento de la muestra con Fucsina básica, tomar algodón con una pinza, cubrir el extremo de la misma a modo de hisopo y humedecer con alcohol 96%.
- Todas las soluciones del presentes kit se encuentran en concentraciones listas para usar. Cualquier agregado a su composición original puede alterar su función y/o estabilidad.

Procedimiento de uso:

Paso	Reactivos / Aplicación	Temp.	Tiempo	Observaciones
1.	Agua destilada / Lavar	RT	10 seg.	n/a
2.	Fucsina básica / Cubrir muestra y flamear con llama	RT	n/a	Hasta desprendere vapor (*1)
3.	Dejar enfriar	RT	2 min.	n/a
4.	Fucsina básica / Cubrir muestra y flamear con llama	RT	n/a	Hasta desprendere vapor (*1)
5.	Decolorante / Gota a gota por arrastre	RT	5 seg.	Decoloración completa
6.	Agua corriente / Lavar	RT	30 seg.	Cortar acción decolorante y eliminar restos ácidos
7.	Azul de Metileno / Cubrir la muestra	RT	1 min.	Contratinción
8.	Agua corriente / Lavar	RT	10 seg.	n/a
9.	Dejar escurrir las muestras en posición vertical	RT	n/a	(*)2
10.	Observar al microscopio de Campo claro con Aceite inmersión	RT	n/a	n/a

Referencias:

- RT: Temperatura ambiente
- n/a: No aplica
- Min: Minutos
- Seg: Segundos

Notas técnicas:

- *1) Pasar la llama por debajo de la muestra, acercándola a cara inferior del preparado. Evitar que la solución de Fucsina básica hierva. Solo calentar hasta que desprenda vapores. En caso de evaporación parcial o total, volver a cubrir con más Sc. de Carbol Fucsina y continuar con el procedimiento.
- *2) En el caso que la muestra en tinción sean cortes histológicos. Luego del lavado en agua corriente, deshidratar, aclarar y montar con Bálsamo sintético y cubreobjeto.

Resultados:

- Bacilos Acido Alcohol Resistentes rosa / rojo
- Núcleos celulares y otras estructuras celeste / azul.

Limitaciones del proceso de tinción:

La técnica de Ziehl Neelsen es un primer paso orientativo para identificación de Mycobacterias en líquidos biológicos. Le permite al laboratorista tener una primera aproximación al germen causal de una infección lo cual, a su vez, permite al médico iniciar el tratamiento con prontitud a la espera de otros resultados de laboratorio. Luego de la realización de la prueba de Ziehl Neelsen, el cultivo de la muestra proveerá información adicional para la identificación del germen y el antibiograma informará la sensibilidad antibiótica del mismo.

Solamente para uso profesional:

La aplicación de este tipo de reactivos debe ser realizada por personal especializado. El usuario deberá cumplir las directivas locales sobre seguridad en el trabajo y aseguramiento de la calidad.

Protección contra infecciones:

El usuario debe considerar el uso de equipamiento de protección personal eficaz contra infecciones de acuerdo con las directivas de trabajo en laboratorio.

Indicaciones para la eliminación de residuos:

El envase debe ser eliminado de acuerdo con las directivas válidas de eliminación de residuos.

Las soluciones usadas y las soluciones caducas deben eliminarse como desecho peligroso, debiéndose cumplir las directivas locales de eliminación de residuos.

Clasificación de sustancias peligrosas:

Tener en cuenta la clasificación de sustancias peligrosas en la etiqueta del producto y las indicaciones de la ficha de datos de seguridad.

Ficha de seguridad del producto en www.biopack.com.ar

Todos nuestros productos cuentan con su correspondiente ficha técnica y de seguridad, disponibles en forma on line: www.biopack.com.ar

Referencias Bibliográficas:

1. American Chemical Society Specification, 8va. Ed., 1993, pág. 103-105,319-321,370-373.
2. Todd Sandford. Diagnóstico clínico por el laboratorio. I. Davidsom, J.B. Henry. 6ta. Ed., Salvat, pág. 139-162.
3. Arthur W.Ham. Tratado de Histología, 7ma. Ed., Interamericana, pág. 235-269.
4. Jay H. Stein, Ed. Medicina Interna. Tomo II. Salvat Editores, 5ta. Reimpresión, Barcelona, 1986, 2064p.
5. Albert Balows, Ed. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Sta. Ed., Washington, 1991, 1364p.

Indicación al consumidor:

El producto está garantizado por el fabricante hasta su fecha de vencimiento si se lo transporta y almacena en las condiciones prescriptas. Ante cualquier consulta, el fabricante puede ser contactado personalmente, por email o por teléfono o ingresando en www.biopack.com.ar solapa de contacto.

Consultar instrucciones de uso en www.biopack.com.ar



Número de catálogo



Reactivo de Uso in Vitro



Elaborador



Consultar instrucciones de uso



Contiene suficientes para <n> pruebas



Elaborado por:

SISTEMAS ANALITICOS S.A.

**Sistemas
Analíticos**

Ruta Nacional 9 km 105,5.

(2800) Zarate, Provincia de Buenos Aires, Republica Argentina.

Director técnico: Marcelo L. Palacios, Farmacéutico M.N. 12407.

Reactivos de Diagnóstico de Uso in Vitro.

Producto autorizado por ANMAT, Cert. N° 3613.

Uso profesional exclusivo