

APLICACIÓN

La tinción de plata de Sigma-Aldrich, Steiner-Steiner modificado, se utiliza para la demostración de espiroquetas y bacterias no filamentosas en cortes de tejido embebidos en parafina. Los reactivos de tinción de plata son para uso diagnóstico *in vitro*.

Los procedimientos documentados para la demostración de espiroquetas y otros microorganismos oportunistas, son los de Warthin-Starry, Dieterle y Steiner-Steiner¹⁻³. Estos procedimientos con frecuencia requieren una elaborada preparación de las soluciones, y los resultados pueden variar sustancialmente.

El método de Sigma-Aldrich es una modificación del método Steiner-Steiner que incluye un aplicación de microondas para acelerar y acentuar la tinción de plata en cortes de tejido. El calor producido en el horno microondas facilita la impregnación del nitrato de plata en los cortes de tejido, produciendo a menudo un fondo más limpio que el método tradicional. Aclarar con agua del grifo y dejar secar al aire, o secar mediante absorción. El procedimiento Steiner-Steiner modificado de Sigma-Aldrich proporciona resultados de tinción constantes y reproducibles.

REACTIVOS

SOLUCIÓN DE NITRATO DE URANILO, número de catálogo HT101-1

Nitrato de uranio, 1 %, en agua.

SOLUCIÓN DE NITRATO DE PLATA, número de catálogo HT101-2

Nitrato de plata, 1 %, en agua.

SOLUCIÓN DE GOMA DE LENTISCO, ALCOHÓLICA, número de catálogo HT101-3

Goma de lentisco en alcohol absoluto.

TABLETAS DE HIDROQUINONA, número de catálogo HT101-4

Hidroquinona, 0,5 g, con excipientes.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Los reactivos de tinción de plata deben almacenarse refrigerados (2–8 °C). Desechar si presenta turbidez. La etiqueta del reactivo indica la fecha de caducidad.

DETERIORO:

Las soluciones de nitrato de uranio, nitrato de plata y goma de lentisco, alcoholólica, deben desecharse si presentan turbidez.

PREPARACIÓN:

La solución de trabajo de hidroquinona se prepara disolviendo una tableta de hidroquinona en 25 ml de agua desionizada. Mezclar bien.

Las soluciones de nitrato de uranio, nitrato de plata y goma de lentisco están listas para usar.

PRECAUCIONES:

Se deben seguir las precauciones normales ejercidas en el manejo de reactivos de laboratorio. Deshacerse de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales. Consultar la Hoja de datos de seguridad del material para obtener cualquier información actualizada sobre riesgos, peligros o seguridad.

Los portaobjetos de control de espiroquetas y helicobacterias TISSUE-TROL son tejidos de conejo o humanos embebidos en parafina con espiroquetas y helicobacterias, y deben considerarse como potencialmente infecciosos.

Declaración de riesgos y seguridad (EE.UU.)

La solución de nitrato de uranio es TÓXICA. Tóxica en caso de inhalación e ingestión. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible). Órganos a los que afecta: riñones e hígado.

Solución de nitrato de plata. Perjudicial para los organismos acuáticos, puede causar efectos adversos a largo plazo en el medio acuático. Precaución: Evitar el contacto y la inhalación. Órganos a los que afecta: sangre y nervios.

La solución de goma de lentisco es INFLAMABLE e IRRITANTE. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Mantener el envase bien cerrado. Mantener el envase en un lugar bien ventilado. Mantener alejada de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada. Órganos a los que afecta: hígado y nervios.

Las tabletas de hidroquinona son TÓXICAS y peligrosas para el medio ambiente. Perjudiciales en caso de ingestión. Irritantes para la piel. Evidencia escasa de un efecto carcinógeno. Riesgo de daño grave para los ojos. Pueden causar sensibilización por contacto con la piel. Muy tóxicas para los organismos acuáticos. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. Evitar su liberación en el medio ambiente. Consultar las hojas de instrucciones y de datos de seguridad.

El alcohol reactivo es INFLAMABLE e IRRITANTE. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Mantener el envase bien cerrado. Mantener alejado de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada. Órganos a los que afecta: nervios e hígado.

El xileno es INFLAMABLE y PERJUDICIAL. Posible riesgo de infertilidad. Puede causar daños al feto. Perjudicial por inhalación y por contacto con la piel. Irritante para el sistema respiratorio y la piel. Riesgo de daño grave para los ojos. Mantener alejado de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

Declaración de riesgos y seguridad (U.E.)

La solución de nitrato de uranio es TÓXICA. Tóxica en caso de inhalación e ingestión. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

Solución de nitrato de plata. Perjudicial para los organismos acuáticos, puede causar efectos adversos a largo plazo en el medio acuático. No inhalar los vapores. Evitar el contacto con la piel y los ojos.

La solución de goma de lentisco es ALTAMENTE INFLAMABLE e IRRITANTE. Altamente inflamable. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Mantener el envase bien cerrado. Mantener alejada de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada.

Las tabletas de hidroquinona son PERJUDICIALES y peligrosas para el medio ambiente. Perjudiciales en caso de ingestión. Evidencia escasa de efectos carcinógenos. Riesgo de daño grave para los ojos. Pueden causar sensibilización por contacto con la piel. Muy tóxicas para los organismos acuáticos. Posible riesgo de efectos irreversibles. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. Evitar su liberación en el medio ambiente. Consultar las hojas de instrucciones y de datos de seguridad.

El alcohol reactivo es ALTAMENTE INFLAMABLE e IRRITANTE. Altamente inflamable. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Mantener el envase bien cerrado. Mantener alejado de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada.

El xileno es PERJUDICIAL. Inflamable. Perjudicial por inhalación y por contacto con la piel. Irritante para la piel. Evitar el contacto con los ojos.

PROCEDIMIENTO

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Se recomienda que la recogida de las muestras se lleve a cabo de acuerdo con las directrices del documento M29-A2 de la NCCLS. Ningún método de prueba puede garantizar la completa seguridad de que las muestras de sangre o tejido no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre o muestras de tejido deben considerarse potencialmente infecciosos.

Fijar las muestras en formol tamponado neutro al 10 %, embeberlas en parafina y cortar secciones de 5 micras.

MATERIAL ESPECIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:

Los portaobjetos de control positivo, tales como los de espiroquetas TISSUE-TROL, número de catálogo S 2645, o los de helicobacterias TISSUE-TROL, número de catálogo H 1898 de Sigma, deben incluirse en cada proceso.

Alcohol absoluto

Alcohol, 95 %

Xileno

SÓLO PARA PROCEDIMIENTOS ESTÁNDAR:

Baños de agua a 45 y 60 °C

Vasos de tinción de Coplin de plástico, con tapas, número de catálogo S 5641

SÓLO PARA PROCEDIMIENTOS CON MICROONDAS:

Horno microondas ACCUMATE™ H2100, números de catálogo A 9084 (110 v), o A 9209 (220 v)

Vasos de Coplin (de plástico) con tapas con respiraderos, número de catálogo S 3883

NOTAS:

No deben utilizarse sustitutos del xileno porque decoloran las espiroquetas⁴.

Si se utiliza el horno microondas H2100 de Sigma-Aldrich, véanse las instrucciones en el Manual del propietario.

Los datos obtenidos mediante este procedimiento sólo sirven como ayuda en el diagnóstico y deben ser revisados junto con otras pruebas clínicas o información de diagnóstico.

PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR:

1. Utilizar vasos de Coplin de plástico limpiados químicamente.
2. Precalentar **40 ml** de nitrato de uranio, número de catálogo HT101-1, y **40 ml** de solución de nitrato de plata, número de catálogo HT101-2, a **60 °C**.
3. Calentar la solución de goma de lentisco, número de catálogo HT101-3, a **temperatura ambiente**.
4. Desparafinar e hidratar los cortes con agua desionizada.
5. Colocar los cortes en solución de nitrato de uranio precalentada, durante **15 minutos** en un baño de agua a **60 °C**.
6. Aclararlos en agua desionizada, cambiándola 3 veces.
7. Colocar los cortes en solución de nitrato de plata precalentada, en un baño de agua a **60 °C** durante **1,5 horas**.
8. Aclararlos en agua desionizada, cambiándola 3 veces.
9. Aclararlos con alcohol al 95 % y etanol absoluto, con dos cambios cada uno.
10. Colocar los cortes en solución de goma de lentisco durante **5 minutos**.
11. Extraer los portaobjetos de la solución de goma de lentisco y dejar que los cortes se sequen al aire.
12. Preparar la solución reductora mezclando **10 ml** de solución de goma de lentisco, número de catálogo HT101-3, **25 ml** de solución de trabajo de hidroquinona y **5 ml** de alcohol absoluto. Filtrar las soluciones con un papel Whatman N° 54 (o equivalente) y añadir **200 µl** de solución de nitrato de plata.
NOTA: La solución reductora puede tener un aspecto lechoso.
13. Calentar la solución reductora en un vaso de Coplin de plástico, **sin portaobjetos**, en un baño de agua a **45 °C**. Añadir cortes para calentar la solución reductora e incubar durante un máximo de **25 minutos**.

- Dejar los portaobjetos en solución reductora a **temperatura ambiente** hasta obtener el grado de tinción negra deseado; lo ideal es de **1–2 minutos**. Si se desea, la tinción puede durar más tiempo. Desechar la solución después de un uso.
- Deshidratar los cortes con alcohol.
- Aclarar con xileno y montar.

PROCEDIMIENTO CON MICROONDAS ACCUMATE™ H2100:

- Desparafinar e hidratar con agua desionizada.
- Colocar los portaobjetos en **40 ml** de solución de nitrato de uranilo, número de catálogo HT101-1, en un vaso de Coplin de plástico. Tapar el vaso sin apretar la tapa, o utilizar tapas con agujeros.
- Poner en el horno microondas a **600 vatios** durante **30 segundos**.
- Aclarar bien varias veces con agua desionizada, cambiando el agua cada vez.
- Colocar los portaobjetos en **40 ml** de solución de nitrato de plata, número de catálogo HT101-2.
- Poner en el horno microondas a **600 vatios** durante **30 segundos**. Mezclar la solución con una pipeta Beral o una varilla aplicadora, y dejarla incubar durante **10 minutos**.
- Aclarar en agua desionizada, cambiándola varias veces.
- Aclarar los portaobjetos con alcohol al 95 % y alcohol absoluto, con dos cambios cada uno.
- Colocar los portaobjetos en solución de goma de lentisco, número de catálogo HT101-3, y dejarlos incubar durante **5 minutos a temperatura ambiente**.
- Extraer los portaobjetos de la solución de goma de lentisco y dejar que los cortes se sequen al aire.
- Preparar la solución reductora mezclando **10 ml** de solución de goma de lentisco, número de catálogo HT101-3, con **25 ml** de solución de trabajo de hidroquinona, y **5 ml** de etanol absoluto. Filtrar la solución y añadir **200 µl (0,2 ml)** de solución de nitrato de plata. Mezclar.
- Poner en el microondas la solución reductora, en un vaso de Coplin de plástico, **sin portaobjetos**, a **600 vatios**, durante **15 segundos**. Mezclar la solución con una pipeta Beral o una varilla aplicadora.
- Poner inmediatamente los portaobjetos en la solución reductora y en el microondas a **400 vatios** durante **20 segundos**.
- Mezclar la solución con una pipeta Beral o una varilla aplicadora, e incubar los portaobjetos en solución reductora hasta obtener el grado de tinción negra deseado. Lo ideal es de **45 segundos a 1 minuto**. Si se desea, la tinción puede durar más tiempo. Desechar la solución después de un uso.
- Aclarar los portaobjetos con agua desionizada.
- Deshidratar en alcohol, aclarar en xileno y montar.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Las espiroquetas y otras bacterias no filamentosas se tiñen de marrón oscuro a negro. Los fondos se tiñen de amarillo brillante a marrón claro.

Si los resultados observados varían de los esperados, póngase en contacto con el Servicio Técnico de Sigma-Aldrich.

REFERENCIAS

- Van Orden AE, Greer PW: Modification of the Dieterle spirochete stain. J Histotechnol 1 (2):51–53, 1977
- Churukian CJ, Schenk EA: A Warthin-Starry method for spirochetes and bacteria using a microwave oven. J Histotechnol 11 (3): 149–151, 1988
- Swisher BL: Modified Steiner procedure microwave staining for spirochetes and nonfilamentous bacteria. J Histotechnol 10 (4): 241–243, 1987
- Davis, Mary M., HT (ASCP): Joy of Microwaving, NSH Symposium, Buffalo, NY, Oct. 1995

Sigma-Aldrich, Inc. garantiza que sus productos concuerdan con la información contenida en ésta y otras publicaciones de Sigma-Aldrich. El comprador debe determinar la idoneidad de los productos para su uso particular. Es posible que deban aplicarse términos y condiciones adicionales. En el reverso de la factura o del albarán se incluyen los términos adicionales y las condiciones de venta.

Procedimiento número HT101
Revisión anterior: 2003-03
Revisión: 2003-09



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham TW20 9BD Reino Unido

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 EE.UU. +1 314 771 5765

Servicio Técnico: a cobro revertido al +1 314 771 3122

o por correo electrónico a clintech@sial.com

Para realizar pedidos: a cobro revertido al +1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

P.O. 1120, 89552 Steinheim, Alemania 49-7329-970