

APLICACIÓN

El kit de tinción de plata de Sigma-Aldrich se utiliza para la demostración histológica de hongos, membrana basal y algunos microorganismos oportunistas. El kit de tinción de plata ACCUSTAIN® es para uso diagnóstico *in vitro*.

Los procedimientos de metenamina-borato de plata están bien documentados^{1,2}, y generalmente requieren una elaborada preparación de la solución antes de realizar la prueba. La estabilidad de la solución es limitada y los resultados varían sustancialmente debido a la naturaleza caprichosa de la impregnación metálica y del desarrollo fotográfico.

Sigma-Aldrich ahora ofrece una tinción de plata que incluye una sal de metenamina de plata estable, con tampón, reactivo de tinción y revelador. Este producto proporciona al laboratorio un medio único para visualizar hongos, la membrana basal y microorganismos oportunistas, como *Pneumocystis carinii*^{3,5}. También se incluyen técnicas de tinción de plata rápidas para hornos microondas^{4,6}.

En resumen, la pared de la célula microbiana y los polisacáridos de la membrana basal se oxidan en aldehídos mediante tratamiento con ácido periódico. El grupo de aldehídos, a pH alcalino, reduce el ion de plata a plata metálica. El aclarado con sales de oro forma un complejo de oro más estable, y el exceso de plata se elimina mediante un lavado con tiosulfato.

REACTIVOS

SOLUCIÓN DE ÁCIDO PERIÓDICO, número de catálogo HT100-1
Ácido periódico, 1 g/dl, en agua desionizada.

SOLUCIÓN DE BORAX, número de catálogo HT100-2
Borax, 5 g/dl, en agua desionizada.

REACTIVO DE METENAMINA DE PLATA, número de catálogo HT100-3
Metenamina de plata, 110 mg/vial.

SOLUCIÓN DE CLORURO DE ORO, número de catálogo HT100-4
Cloruro de oro, 200 mg/dl, en agua desionizada.

SOLUCIÓN DE TIOSULFATO SÓDICO, número de catálogo HT100-5
Tiosulfato sódico, 2 g/dl, en agua desionizada.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Almacenar refrigerados (2–8 °C) la solución de ácido periódico, el reactivo de metenamina de plata, la solución de cloruro de oro y la solución de tiosulfato sódico.

Almacenar la solución de borax a temperatura ambiente (18–26 °C). NOTA: El borax puede formar precipitado durante la refrigeración. Estabilizar a temperatura ambiente y volver a disolverlo antes de su uso.

Las etiquetas de los reactivos indican la fecha de caducidad.

PREPARACIÓN:

Preparar la solución de trabajo de metenamina de plata mezclando 8 ml de solución de borax, 100 ml de agua desionizada y el contenido del vial del reactivo metenamina de plata. Mezclar hasta su total disolución. Utilizar una sola vez y desecharlo.

NOTA: Para aumentar las pruebas por vial a dos, la metenamina de plata puede disolverse en 100 ml de agua desionizada y almacenarse herméticamente cerrada. En refrigeración (2–8 °C) es estable durante 1 mes. En el momento de utilizarlo, añada 4 ml de solución de borax a 50 ml de solución de metenamina de plata. Devolver la solución de metenamina de plata sobrante al frigorífico.

Estabilizar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

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. 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. Consultar la Hoja de datos de seguridad del material para obtener cualquier información actualizada sobre riesgos, peligros o seguridad.

Los portaobjetos de control de hongos y neumocistas TISSUE-TROL son tejidos humanos embebidos en parafina con hongos/neumocistas y deben considerarse como potencialmente infecciosos.

Declaración de riesgos y seguridad (EE.UU.)

La solución de ácido periódico es CORROSIVA. Provoca quemaduras. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Desprenderse inmediatamente de todas las ropas contaminadas. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro.

Solución de borax: Precaución: Sustancia en proceso de prueba. Evitar el contacto y la inhalación.

El reactivo metenamina de plata es CORROSIVO. Perjudicial en caso de ingestión. Provoca quemaduras. Evidencia escasa de efectos carcinógenos. Puede causar sensibilización por inhalación y contacto con la piel. 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). Órganos a los que afecta: riñones y ojos.

La solución de cloruro de oro es IRRITANTE. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa y guantes protectores adecuados.

La solución de tiosulfato sódico es IRRITANTE. Irritante para los ojos y la piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar guantes adecuados y protección para los ojos y el rostro.

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).

El formol tamponado neutro al 10 % es PERJUDICIAL. Perjudicial por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Perjudicial: posible riesgo de efectos irreversibles por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Puede causar sensibilización por inhalación y contacto con la piel. No inhalar los vapores. Usar ropa y guantes protectores adecuados. 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 ácido periódico es CORROSIVA. Provoca quemaduras. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Desprenderse inmediatamente de todas las ropas contaminadas. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro.

Solución de borax: Evitar el contacto con la piel y los ojos.

El reactivo metenamina de plata es CORROSIVO. Perjudicial en caso de ingestión. Provoca quemaduras. Evidencia escasa de efectos carcinógenos. Puede causar sensibilización por inhalación y contacto con la piel. 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).

La solución de cloruro de oro es IRRITANTE. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa y guantes protectores adecuados.

Solución de tiosulfato sódico. Evitar el contacto con la piel y los ojos.

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.

El formol tamponado neutro al 10 % es PERJUDICIAL. Perjudicial por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Evidencia escasa de efectos carcinógenos. Puede causar sensibilización por contacto con la piel. Usar ropa y guantes protectores adecuados.

PROCEDIMIENTO

RECOGIDA DE LA MUESTRA:

Se recomienda que la recogida de la muestra 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.

Hongos y microorganismos oportunistas, como *P. carinii*: Fijar en formol tamponado neutro al 10 % o en solución de Bouin, embebidos en parafina, y realizar cortes de 5 micras¹.

Membrana basal: Fijar en formol tamponado neutro al 10 % o en solución de Bouin o de Zenker, y realizar cortes en parafina de 1-4 micras¹.

MATERIAL ESPECIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:

Fórceps de plástico o de metal recubiertos con parafina
Los portaobjetos de control, tales como los de hongos TISSUE-TROL, número de catálogo F 0766 o los de neumocistas TISSUE-TROL, número de catálogo P 2418 de Sigma, deben incluirse en cada proceso.

SÓLO PARA PROCEDIMIENTOS ESTÁNDAR:

Baño de agua a 62 °C

SÓLO PARA PROCEDIMIENTOS CON MICROONDAS:

Vasos de Coplin de plástico con tapas
Horno microondas Accumate™ H2100, número de catálogo A 9084, (110 voltios) o número de catálogo A 9209, (220 voltios)

NOTAS:

- Los platos de tinción deben lavarse con concentrado de limpiador líquido de laboratorio SIGMACLEAN™, número de catálogo S 4107, y con solución blanqueadora; deben aclararse bien con agua del grifo y luego con agua desionizada realizando al menos 6 cambios.

- Los portaobjetos de control adecuados, como: los de hongos TISSUE-TROL, número de catálogo F 0766 o los de neumocistes TISSUE-TROL, número de catálogo P 2418 de Sigma, deben incluirse en cada proceso.
- 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:

- Preparar la solución de trabajo de metenamina de plata, tal como se describe en la sección "Preparación", y colocarla en un baño de agua a 62 °C.
NOTA: No dejar que la solución de metenamina de plata entre en contacto con metales. Comprobar que la temperatura de la solución sea de al menos 62 °C.
- Desparafinar los cortes de tejido y rehidratar con agua desionizada.
- Colocar los cortes rehidratados en solución de ácido periódico, número de catálogo HT100-1, durante **5 minutos** para hongos y microorganismos oportunistas, u **11 minutos** para la membrana basal.
- Extraer los portaobjetos y aclararlos con agua desionizada, realizando 6 cambios.
- Para la demostración de hongos y microorganismos oportunistas**, colocar los portaobjetos en la solución de trabajo de metenamina de plata precalentada. Examinar en el microscopio después de **20 minutos**. Los hongos y los microorganismos oportunistas deben ser de color marrón oscuro contra un fondo amarillo pálido.
Para la demostración de la membrana basal, colocar los portaobjetos en la solución de trabajo de metenamina de plata precalentada. Examinar en el microscopio después de **30 minutos**. La membrana basal debe ser negra contra un fondo entre amarillo oscuro y marrón.
NOTA: Mientras se incuban los cortes a 62 °C, colocar un vaso de Coplin con agua desionizada en un baño de agua a 62 °C. Utilizar este agua para el aclarado antes de la evaluación del paso 5. Examinar los cortes en el microscopio para comprobar la tinción adecuada a los intervalos establecidos. Devolver los portaobjetos a la solución de metenamina de plata caliente, hasta que se obtenga la intensidad deseada.
- Extraer los portaobjetos de la solución de trabajo de metenamina de plata una vez se haya obtenido la tinción estructural adecuada, y aclarar 6 veces con agua desionizada a temperatura ambiente.
- Teñir las secciones con solución de cloruro de oro, número de catálogo HT100-4, durante **30 segundos**.
- Aclarar 6 veces con agua desionizada a temperatura ambiente.
- Colocar los cortes en solución de tiosulfato sódico, número de catálogo HT100-5, durante **2 minutos**.
- Lavar bien con agua corriente del grifo.
- Contrateñir, según las preferencias personales, con solución de tartrazina, Fast Green FCF, Light Green SF amarillento, solución de hematoxilina de Harris, o solución de eosina Y.
- Deshidratar en alcohol, aclarar en xileno, montar y examinar con el microscopio.

PROCEDIMIENTO CON MICROONDAS ACCUMATE™ H2100:

- Desparafinar e hidratar los portaobjetos con agua desionizada.
- Colocar los portaobjetos en **40 ml** de solución de ácido periódico, número de catálogo HT100-1, dentro de un vaso de Coplin de plástico. Tapar el vaso de Coplin sin apretar la tapa, antes de colocarlo en el horno microondas, o utilice vasos de Coplin con agujeros en las tapas. Poner en el horno microondas a **800 vatios** durante **10 segundos**.
***La solución de ácido periódico puede volver a utilizarse sólo si se ha usado a temperatura ambiente durante **5 minutos** en lugar de usar el microondas. ***Para las membranas basales, el tiempo de incubación de la solución de ácido periódico es de **11 minutos a temperatura ambiente**.
- Extraer los portaobjetos de la solución de ácido periódico y aclararlos con agua desionizada, realizando 6 cambios.
- Colocar los portaobjetos en **40 ml** de solución de trabajo de metenamina de plata, dentro de un vaso de Coplin de plástico.
- a. **Para microorganismos fúngicos**, utilizar el microondas a **600 vatios** durante **35 segundos**. Mezclar cuidadosamente la solución con una pipeta Beral o una varilla aplicadora. Dejarla incubar durante **2-3 minutos**. Tras un máximo de **2 a 3 minutos**, colocar los portaobjetos en agua desionizada caliente y comprobar el desarrollo con el microscopio. Si los microorganismos no están suficientemente desarrollados, volver a poner los portaobjetos en la solución de metenamina de plata y dejarlos allí de **30 segundos a 1 minuto**.

NOTA: Tiempos de desarrollo sugeridos para los siguientes organismos fúngicos:

Blastomices	2 minutos
Neumocistes	2-3 minutos
Aspergillus	2-3 minutos

- Para la membrana basal**, utilizar el microondas a **600 vatios** durante **35 segundos**. Agitar con cuidado la solución. Dejar incubar los portaobjetos durante **5 minutos**. Ponerlos por segunda vez en el horno microondas a **600 vatios** durante **10 segundos**. Dejar incubar los portaobjetos durante 2 minutos. Comprobar los portaobjetos con el microscopio. Si los portaobjetos no están suficientemente desarrollados, repetir el último paso hasta conseguir el tono deseado.
- Aclarar los portaobjetos en agua desionizada, cambiándola 6 veces.
- Teñir los portaobjetos con solución de cloruro de oro, número de catálogo HT100-4, durante **30 segundos a temperatura ambiente**.
- Aclarar los portaobjetos en agua desionizada, cambiándola 6 veces.
- Colocar los portaobjetos en solución de tiosulfato de sodio, número de catálogo HT100-5, durante **2 minutos a temperatura ambiente**.
- Lavar bien con agua corriente del grifo.
- Contrateñir, según las preferencias personales, con Fast Green FCF, Light Green SF amarillento, o tartrazina, o soluciones de hematoxilina o eosina Y.
- Deshidratar en alcohol, aclarar en xileno, montar y examinar con el microscopio.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Hongos	de marrón-púrpura a negro
P. carinii	de marrón-púrpura a negro
Membrana basal	negro
Fondo	según la contrateñición

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

REFERENCIAS

- Sheehan DC, Hrapchak BB: Theory and Practice of Histotechnology, 2nd ed., CV Mosby Co. St. Louis (MO), 1980
- Koski JP: Silver methenamine-borate (SMB): Cost reduction with technical improvement in silver nitrate-gold chloride impregnations. J Histotechnol 4:115, 1981
- Churukian CJ, Schenk EA, Clark G: Dilute ammoniacal silver as a substitute for methenamine silver to demonstrate *Pneumocystis carinii* and fungi. Lab Med 17:87, 1986
- Musto L, Flanigan M, Elbadawi A: Ten-minute silver stain for *Pneumocystis carinii* and fungi in tissue sections. Arch Pathol Lab Med 106:292, 1982
- Tseng CH: New stain for fungi and basement membrane. Arch Pathol Lab Med 109:196, 1985
- Leong AS-Y, Milios J: Rapid immunoperoxidase staining of lymphocyte antigens using microwave irradiation. J Pathol 148:183, 1986
- Brinn NT: Rapid metallic histologic staining using the microwave oven. J Histotechnol 6:125, 1983
- Valle S: Special stains in microwave oven. J Histotechnol 9:237, 1986
- Carson Frieda, Histotechnology: A Self Instructional Text, ASCP Press, Chicago 1990
- Kok and Boon, Microwave Cookbook for Microscopists, Coulomb Press Leydon Leiden 1992

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 HT100
Revisión anterior: 2003-04
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