



TÉCNICA DE GROCOTT Y BLOQUE CELULAR PARA EVIDENCIAR PRESENCIA DE MICOSIS EN EFUSIONES PLEURALES

Autores: Tayda Ramos Remedios¹, Thalya Mendivia Ramos², Tahys Mendivia Ramos³, Yadira Gamboa González⁴, Alexon Hernández Pérez⁵.

¹. Licenciada en Citohistopatología, Departamento de Anatomía Patológica. Hospital General Docente Comandante Pinares. Artemisa Cuba.

². Estudiante segundo año de la carrera de Medicina, FCM, Comandante Piti Fajardo. Artemisa Cuba.

³- Estudiante segundo año de la carrera de Medicina, FCM, Comandante Piti Fajardo. Artemisa Cuba.

⁴- Profesora Asistente Departamento Informática, FCM, Comandante Piti Fajardo. Artemisa Cuba.

⁵- Estudiante segundo año de la carrera de Medicina, FCM, Comandante Piti Fajardo. Artemisa Cuba.

email:tramo@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: Los hongos son en general relativamente grandes y morfológicamente diversos, y pueden presentarse en los tejidos en diversas formas: como hifas, esporas, levaduras, endosporas, o una combinación de estas formas. La tinción de Grocott es probablemente la más conocida para la tinción de organismos micóticos, Particularmente útil en el estudio de efusiones pleurales.

Objetivo: Demostrar la importancia del bloque celular y el método de Grocott en el estudio de la efusión pleural.

Material y Método: Utilizamos 20 ml de líquido Pleural, centrifugamos durante 15 minutos a 1500 RPM, colocamos el sedimento en papel de filtro dentro de una cápsulas o rejilla, lo fijamos en formol al 10% por 6 horas, procesándolo de manera rutinaria en los laboratorios de Anatomía, posteriormente se realiza la coloración por método de GROCOTT.

Resultados: Elementos Fúngicos color negro, Fondo color verde.



Conclusiones: La combinación de las técnicas de GROCOTT Y Bloques Celulares constituye un método factible para el estudio de las micosis en efusiones pleurales. El bloque celular aumenta el rendimiento del material a estudiar ya que pueden archivarse para utilizar con fines docentes e investigativos.

Palabras claves: Grocott, Bloque Celular, Elementos Fúngicos

INTRODUCCIÓN

Los hongos son en general relativamente grandes y morfológicamente diversos, y pueden presentarse en los tejidos en diversas formas: como hifas, esporas, levaduras, endosporas, o una combinación de estas formas.(1)La tinción de Grocott es probablemente la más conocida para la tinción de organismos micóticos, Particularmente útil en el estudio de efusiones pleurales, aspirados bronquiales, esputos inducidos y biopsias pulmonares utilizados para identificar hongos de tipo Pneumocystis Carinii u otros tipos de hongos que son oportunistas como aspergillus presentes en la etiología de las neumonías.(2.3)

Las paredes celulares de los hongos son ricas en polisacáridos que se oxidan, al ponerse en contacto con el ácido crómico, se convierten en aldehídos. Estos grupos aldehídos reducen iones de la solución de Plata metenamina a plata metálica confiriéndole a la pared fúngica un color café-negro-grisáceo, el color está dado por el depósito de plata reducida en el sitio en que se localizan los aldehídos. La intensidad de la coloración obtenida con estas técnicas depende básicamente, de la cantidad de aldehídos presentes en la pared de los hongos. (3-5) El BC Consiste en la preparación de material citológico concentrado (sedimento, coágulos, fragmentos de tejido flotantes) en bloques de parafina para un uso diagnóstico similar a la histología.

Se puede aplicar a una gran variedad de muestras citológicas, en efusiones pleurales aumenta su rentabilidad. (6)

OBJETIVO

Demostrar la importancia del método de Grocott y el bloque celular para evidenciar presencia de micosis en efusiones pleurales.

MATERIAL Y MÉTODO

Para realizar el bloque celular (BC) utilizamos 20 ml de líquido Pleural, recibidos en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General Docente Comandante Pinares para estudios citológico, centrifugamos durante



15 minutos a 1500 RPM, colocamos el sedimento en papel de filtro dentro de una cápsulas o rejilla, lo fijamos en formol al 10% por 6 horas, para ser insertados en el procesador automático de tejidos, el cual realizó de manera automática los sucesivos cambios de líquidos. Se deshidrató en alcoholes de gradación creciente, se aclaró, o desalcoholizó en Xilol e infiltró en parafina líquida, una vez terminado el proceso realizamos inclusión en parafina con ayuda de un dispensador y cortes histológicos seriados de cuatro a cinco micra de espesor en el micrótopo vertical o rotatorio, colocamos el corte en una lámina porta objeto, iniciamos la desparafinación en la estufa por espacio de 60 minutos. Utilizamos una lámina de un caso con diagnóstico positivo evidenciado por el servicio de Microbiología del mismo Hospital, como lámina control.

Método de Coloración de Grocott.

Procedimiento:

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
2. Agregar Ácido peryódico al 1% por 10 minutos.
3. Lavar con agua destilada.
4. En un recipiente limpio agregar la Solución de Trabajo, colocar la lámina dentro y dejar en estufa por 50 minutos.
5. Retirar y revisar la muestra, si falta intensidad en la reacción colocar por 5 minutos más.
6. Lavar con agua destilada.
7. Agregar Cloruro de oro hasta retirar el excedente y el fondo de la muestra este limpio.
8. Agregar Tiosulfato de Sodio al 5% por 2 minutos aproximadamente. Revisar la muestra al microscopio.
9. Agregar Light Green por 30 segundos a 1 minuto.
10. Deshidratar en alcoholes Ascendentes
11. Aclarar en tres pasos de Xilol.
12. Montar con Resina adecuada.

Resultados

- Elementos fúngicos. Color negro
- Fondo de muestra. Color verde



RESULTADOS

La micosis es el agente etiológico causante de ciertas patologías, que pueden causar infecciones persistentes en el tracto respiratorio. Se han realizado varias investigaciones en relación a su diagnóstico histopatológico en las que se han empleado métodos de coloraciones diferentes basándose en la identificación de los microorganismos con apropiada morfología(6) el método GROTT, mediante el mecanismo de oxidación –reducción favorece el depósito de plata reducida en las paredes de los elementos fúngicos confiriéndoles grosor y un color Negro, que contrasta con un fondo de color verde, evidenciando inequívocamente su presencia en los extendidos.(2,3,8,10)

El bloque celular conserva el material intacto ya que se obtiene bloques en parafina de fácil manejo, dureza homogénea, plasticidad y consistencia que permite realizar cortes muy delgados con una mínima modificación de la morfología celular.(6)

CONCLUSIONES

- La combinación de las técnicas de GROCOTT Y Bloques Celulares constituye un método factible para el estudio de las micosis en efusiones pleurales.
- El bloque celular aumenta el rendimiento del material a estudiar ya que pueden archivarse para utilizar con fines docentes e investigativos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mayayo Artal, E. (2004). Diagnóstico histopatológico de las micosis. Revista Iberoamericana de Micología, 21: 1-19. Recuperado el 5 de Diciembre de 2015.
<http://www.reviberoammicol.com/2004-21/001009.pdf>
2. World Heritage Encyclopedia. (14 de Julio de 2016). Grocott's methenamine silver stain. Obtenido de World Public Library Association:
http://gejl.info/articles/Grocott's_methenamine_silver_stain
3. Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. Á. (27 de 02 de 2015). HISTOQUÍMICA. Recuperado el 22 de 11 de 2015, de Atlas de histología vegetal y animal. Universidad de Vigo España:
<http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-histoquimica.php>
4. Montalvo C. Técnica Histológica. [Revista en línea]. 2010
5. Jinsong Z. Histochemistry. 1era Edición. Germany: De Gruyter; 2017.



6. Nathan NA, Narayan E, Smith MM, Horn MJ. Cell Block Cytology. Improved Preparation and its efficacy in diagnostic cytology. Am J Clin Pathol 2000;114:599-606.
7. Herrera-García, José Carlos. Derrame pleural: ruta diagnóstica inicial. Departamento de Cardio Neumología, Fundación Madonna Di Guadalupe, Puebla, Puebla, México. 2015 <http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2015/mim152i.pdf>
8. Ricardo M, Raquel G. Fundamentos teóricos y prácticos de la Histoquímica. 1era Edición. España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 2008
9. Richard H, Gustav F. Histochemistry: An explanatory outline of histochemistry and biophysical staining. 2nd. ed. Germany: Butterwoths; 1982.



ANEXO

PREPARAR SOLUCIONES.

Soluciones.

- Ácido Peryódico al 1%
 - Ácido Peryódico _____ 1 gr
 - Agua destilada _____ 100 ml

- Metanamina al 3%
 - Metanamina _____ 3 gr
 - Agua destilada _____ 100 ml

- Nitrato de plata al 10%
 - Nitrato de plata _____ 10 gr
 - Agua destilada _____ 100 ml

- Borax al 5%
 - Borax _____ 5 gr
 - Agua destilada _____ 100 ml

- Cloruro de Oro al 1%
 - Solución Matriz al 1% ____ ampolla de 1mL en 99mL de agua destilada.

Nota. Para romper la ampolla de cloruro de oro, primero serruche superficialmente usando un marcador con punta diamante, luego coloque la ampolla en una botella grande que tenga un tapón de vidrio. Añada la mitad del agua (aproximadamente asegure bien el tapón, y agite vigorosamente.

Tan pronto la ampolla se rompa dentro de la botella, añada los otros 54 ml de agua destilada. Filtre.

- Al 0.1% _____ 10mL de solución matriz de Cloruro de Oro al 1% y 90 ml de agua destilada.
- Al 0.2% _____ 20mL de solución matriz de Cloruro de Oro al 1% y 80 ml de agua destilada.



- Tiosulfato de Sodio al 5%
 - Tiosulfato de Sodio _____ 5 gr
 - Agua destilada _____ 100 ml

- Light Green al 0.4%
 - Solución Matriz _____ 0.4 gr de light Green. SF amarillento en 100mL de agua destilada.
 - Solución diaria _____ 10 ml de la solución matriz de light verde en 50 ml de agua destilada

- Solución de Trabajo GROCOTT: Vf=26 ml

En un tubo cónico limpio agregar las siguientes soluciones:

- Metanamina al 3% _____ 12.5 ml
- Nitrato de plata al 10% _____ 0.5 ml

Retirar 0.5 ml y descartar, agregar las siguientes soluciones:

- Agua destilada _____ 12.5 ml
- Bórax al 5% _____ 1 ml