

RESEÑA HISTORICA

Cien años del colorante de Giemsa

José Perea-Sasiaín

Laboratorio de Microscopía, Sección de Biología Celular, Departamento de Morfología,
Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

Esta es una revisión general de los trabajos previos y subsecuentes al hallazgo del colorante de Giemsa, con énfasis en los azules de metileno policromos. Se presenta un breve bosquejo biográfico de Berthold Gustav Carl Giemsa, así como de la constitución y mecanismo de acción de su colorante y el resultado de análisis únicos por HPLC de su azur II (azul de metileno, 63,6%; azur B, 28,6%; azur A 4, 4%; azur C, 1,4%, y tionina, 1,9%). Por tanto, el azur I no era 'puro' sino una mezcla de tionina y todos sus derivados metilados en los grupos amina 3 y 7, muy probablemente preparada por oxidación del azul de metileno en medio ácido como lo definió Lillie. Se tabulan los usos del colorante de Giemsa informados durante los últimos 32 años.

Palabras clave: Giemsa, azur, azul de metileno, azul policromo.

Giemsa stain: one hundred years of discovery

Research work associated with the development of Giemsa stain is reviewed, with emphasis on the methylene blue polychromes. A short biographical sketch of Dr. Berthold Gustav Carl Giemsa is presented, along with the composition of his original formulation and its mechanism. HPLC analyses of his azur II indicated the following composition: methylene blue 63.6%, azur B 28.6%, azur A 4.4%, azur C 1.4%, thionin 1.9%. Azur I was not "pure", but rather a mixture of thionin and all of its 3 and 7 N-methylated derivatives. Lillie inferred that it was probably prepared by an acid oxidation process. Applications of Giemsa stain reported in the last 32 years are tabulated.

Key words: Giemsa, azure, methylene blue, polychrome methylene blue.

Antecedentes históricos

En 1880, Laveran comunicó (1) sus observaciones sobre lo que se llamó hematozoario y lo postuló como agente causal de la malaria (paludismo): el mérito extraordinario de ellas radica en el hecho de que los microscopios de luz en su época todavía no tenían totalmente perfeccionada la óptica de alta resolución y el condensador de luz de Abbe (que hubiera facilitado la observación sin teñir los parásitos) no se había aún generalizado. Igualmente, Laveran tuvo que vencer la aseveración, generalmente admitida en ese momento, de ser una bacteria el agente causal de la malaria.

La tinción diferencial de la cromatina y el citoplasma de los plasmodios mediante el uso de

soluciones de eosina amarillenta y de azul de metileno (figura 1, I), esta última envejecida, según la leyenda, con una película superficial de moho, fue publicada por Romanowsky en 1891 (2) y resolvió toda duda que pudiera quedar sobre el papel de los plasmodios como causa directa de la malaria.

La siguiente década se caracterizó en este campo por la búsqueda de mezclas colorantes que aseguraran la tinción sistemática de dicha cromatina. Este período ha sido muy bien relatado por Woronzoff-Dashkoff (2), como se resume en el cuadro 1, con otras referencias a trabajos sobre esos colorantes (3-23).

Policromos del azul de metileno

Policromo significa de muchos colores y, en este caso, se refiere a la capacidad de teñir así que tiene un colorante. Las soluciones de azul de metileno se oxidan lentamente y eso explica el hallazgo de Romanowsky, pero no si el moho

Correspondencia:

Transversal 31 No. 101-18, Bogotá, D.C., Colombia.
josepesa@bacata.usc.unal.edu.co

Recibido: 05/09/02; aceptado: 14/02/03

Cuadro 1. Antecedentes históricos hasta el colorante de Giemsa.

Año	Autor	Trabajo reportado	Referencia
1871	Caro*	Síntesis de la eosina amarillenta (figura1a)	3 (p. 4426)
1876	Caro*	Síntesis del azul de metileno (figura 1b)	3 (p. 4470)
1882	Koch*	Tinción <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con azul policromo	4
1884	Loeffler*	Tinción <i>Corynebacterium diphtheriae</i> con azul policromo	5
1885	Sahlí*	Azul policromo por tetraborato de sodio (bórax)	6
1885	Bernthsen*	Síntesis industrial mejorada del azul de metileno	7
1885	Bernthsen*	Preparación del azul de metileno por oxidación del azul	7
1885	Simon*	Propone la formación del azul por desmetilación	3 (p. 4470)
1888	Chenzinsky	Tinción del <i>Plasmodium</i> en azul con AM y EA	2
1890	Plehn	Tinción del <i>Plasmodium</i> en azul con AM impuro y EA	2
1885	Unna*	Azul policromo por acción de carbonatos alcalinos	8
1891	Malachowski	Tinción roja cromatina plasmodial con EA-AM y bórax	2
1891	Romanowsky	Tinción roja de la cromatina del plasmodio con EA-AM	2
1895	Bremer*	Precipitación del eosinato de azul de metileno	9
1899	Nocht	Separación del azul ('rojo') del azul policromo	2
1899	Jenner	Preparación eosinato de azul de metileno	10
1899	Laveran-Borrel*	Tinción con azul policromo por óxido de plata	11
1901	Leishman	Preparación eosinato de azul policromo	12
1901	Reuter	Preparación eosinato de su azul policromo	13
1901	Lazear*	Tinción del plasmodio con eosina y azul policromo	14
1902	May y Grunwald	Tinción de sangre con eosinato de azul de metileno	15
1902	Wright	Tinción de sangre con eosinato de su azul policromo	16
1902	Giemsa	Preparación de azures I* y II y su mezcla con eosina**	**17, **18
1904	Giemsa	Puesta en punto del colorante de Giemsa	19

* Caro sintetizó tanto la eosina amarillenta (EA) como el azul de metileno (AM), pero debe tenerse en cuenta que en 1885, Bernthsen realizó una nueva y excelente síntesis industrial del azul de metileno cuyo uso aún se mantiene. Esta síntesis tiene una fase final de oxidación con bicromato de potasio, por lo cual se produce algo de azul B (8 muestras tuvieron un promedio de 4,1% con mínimo de 3,0% y máximo de 5,1%) (20), que acompaña al azul de metileno del comercio, así se trate del más 'puro' y los intentos para purificarlo determinan casi siempre un incremento en su contenido de azul (21). Su purificación (22) por extracción es laboriosa y no se justifica salvo para estudios o usos que ameriten su homogeneidad, en particular los que se hacen con seres humanos vivos. Ehrlich, citado en primer lugar por Woronzoff-Dashkoff (2), realizó los primeros trabajos biológicos con azul de metileno (23), como lo reconoce elegantemente Bernthsen.

aceleró el proceso. La oxidación del azul de metileno se realiza sobre los grupos metilos eliminándolos sucesivamente y se llega a producir todos los derivados metilados en los grupos amino primarios de la tionina, incluso ésta (figura 1, VI). El factor que no fue seriamente considerado por casi ningún autor, aparte de Kehrmann, es el hecho de que los compuestos demetilados siguen siendo oxidados y, por tanto, es imposible obtener un producto intermediario de dicha cadena sin que existan sus antecesores y los subsecuentes (24). Bernhard Nocht separó el colorante que tiñe, en asocio con la eosina, la cromatina del plasmodio y lo llamó "rojo del azul de metileno". Posteriormente, su colaborador principal en el área química, Giemsa, mostró que ese colorante es el que Bernthsen había llamado azul y había

considerado, equivocadamente, que era la sulfona del azul de metileno.

Kehrmann demostró (24) que el azul es la mezcla de, por lo menos, dos derivados demetilados del azul de metileno: el azul B (figura 1, II) o trimetiltionina y el azul A (figura 1, IV) o dimetiltionina asimétrica.

Métodos para obtener azul policromo

Como señaló Lillie en sus publicaciones fundamentales (25,26), los métodos de oxidación usados se pueden dividir en dos grupos: ácidos y básicos (figura 1). Los primeros métodos para realizar una oxidación progresiva de la solución del azul de metileno mediante el uso de bases se utilizaron en bacteriología: Koch y Loeffler demostraron los bacilos (4,5) que recibieron, en

justo homenaje, los nombres del primero y el de Klebs-Loeffler, con el azul policromo que aún se conoce como azul de metileno alcalino de Loeffler (27). Es lógico que el mismo procedimiento general (6,8) se usara con el fin de lograr la coloración roja de la cromatina de los plasmodios como debió hacer Malachowski (2) con el azul policromo por acción del bórax (6).

Oxidación en medio ácido

La oxidación en medio ácido se realizó con bicromato de potasio o de sodio con adición de ácido clorhídrico a la solución diluida y en condiciones controladas (28). Lillie estudió en forma muy completa este tipo de oxidación (25), cambiando condiciones de concentración, temperatura y tiempo, y logró un colorante de resultados idénticos al de Giemsa (29). Poco después, Singh y Bhattacharji lograron el mismo resultado en India (30) donde estudios recientes equiparan totalmente sus resultados a los del colorante de Giemsa (31). En 1979, Russo y Lillie demostraron (32) que la relación AzB/AM puede variar entre 17,5 y 34,1% para lograr la coloración roja típica de la cromatina plasmoidal: la relación óptima es 25,3%, en comparación con el resultado obtenido en 1942 con concentraciones del 42%. Lillie ya había recomendado proporciones y condiciones de coloración ligeramente diferentes para extendidos de sangre con el fin de estudiar su citología o para teñir los plasmodios (33). Los resultados obtenidos por Marshall mediante el análisis con cromatografía de capa fina de alta resolución (34) de colorantes obtenidos en el comercio (35), así como de muchos que preparó siguiendo el método propuesto por diversos autores (36), muestran que por oxidación en ácido se produce más dimetiltionina simétrica que azur A (figura 1, III y IV) y azur C (figura 1, V), pero en ningún caso tabula derivados de la tionolina (figura 1, IX) (35,36). Por su controversia con Marino en 1905 (37), en la que Giemsa se manifiesta abiertamente en contra de la preparación del azul policromo con bases, me inclino a pensar que utilizó un método de oxidación ácida, siguiendo probablemente el proceso de Simon. Otros autores modificaron los métodos anteriores (38-40). La oxidación mediante el bicromato de potasio sin adición de ácido dio

buenos resultados (41), pero hay que tener en cuenta que el pH de esta solución es inferior a 5 (42). El *Colour Index* da también como método preparativo para el azul B esta oxidación (3).

Oxidación en medio alcalino

La oxidación en medio alcalino es la que da mayor variedad de tonalidades y fue ésta la razón del calificativo policromo. Es la más compleja (figura 1) y sus resultados los más difíciles de controlar como lo demostró Lillie (26). El ión hidroxilo ataca los grupos metilos sucesivamente, formando primero azur B y enseguida más azur A que dimetiltionina simétrica (35). Simultáneamente, se elimina uno de los grupos dimetilamino del azul de metileno dando lugar al violeta de metileno de Bernthsen o dimetiltionolina (figura 1, VII), metiltionolina (figura 1, VIII) y tionolina (figura 1, IX). Cuando la oxidación es extrema se puede producir incluso tionol (figura 1, X) (43). Desde un comienzo, el papel del violeta de metileno fue muy controvertido: Giemsa le negó importancia, pero añadió carbonato de potasio en la coloración para el *Treponema pallidum* Schaudinn propuesta por él (44) después de la controversia con Marino (37,45), quien le había recomendado ensayarlo (46). Un año después, en 1906, MacNeal (47) demostró la importancia del violeta de metileno en coloraciones como la suya para el *Treponema pallidum* Schaudinn. Las primeras bases usadas fueron la potasa y soda cáusticas que a altas concentraciones, cuyo pH es de 14, descomponen rápidamente el azul de metileno; el uso de soluciones con menores concentraciones, cuyo pH baja a 12 para soluciones 0,01 N (42), dio resultados más satisfactorios y así se usó el hidróxido de potasio (4,5,48-50), de sodio (51-56) y de amonio (57-60). Los carbonatos de los elementos del grupo II, cuyas soluciones llegan a tener un pH de 11,6 (42), se han empleado ampliamente, en particular el de sodio, directamente (27,61-68) o mediante el azul policromo de Unna (8,69-71), el de potasio (27,72-74) e incluso el de litio (75). Merece mención especial el bicarbonato de sodio utilizado por Reuter (13), Wright (16), Wilson (76) y Mc Clung (77) cuya solución tiene un pH de 8,5, pero al calentarla el bicarbonato se transforma en carbonato y el pH de la solución sube; los análisis

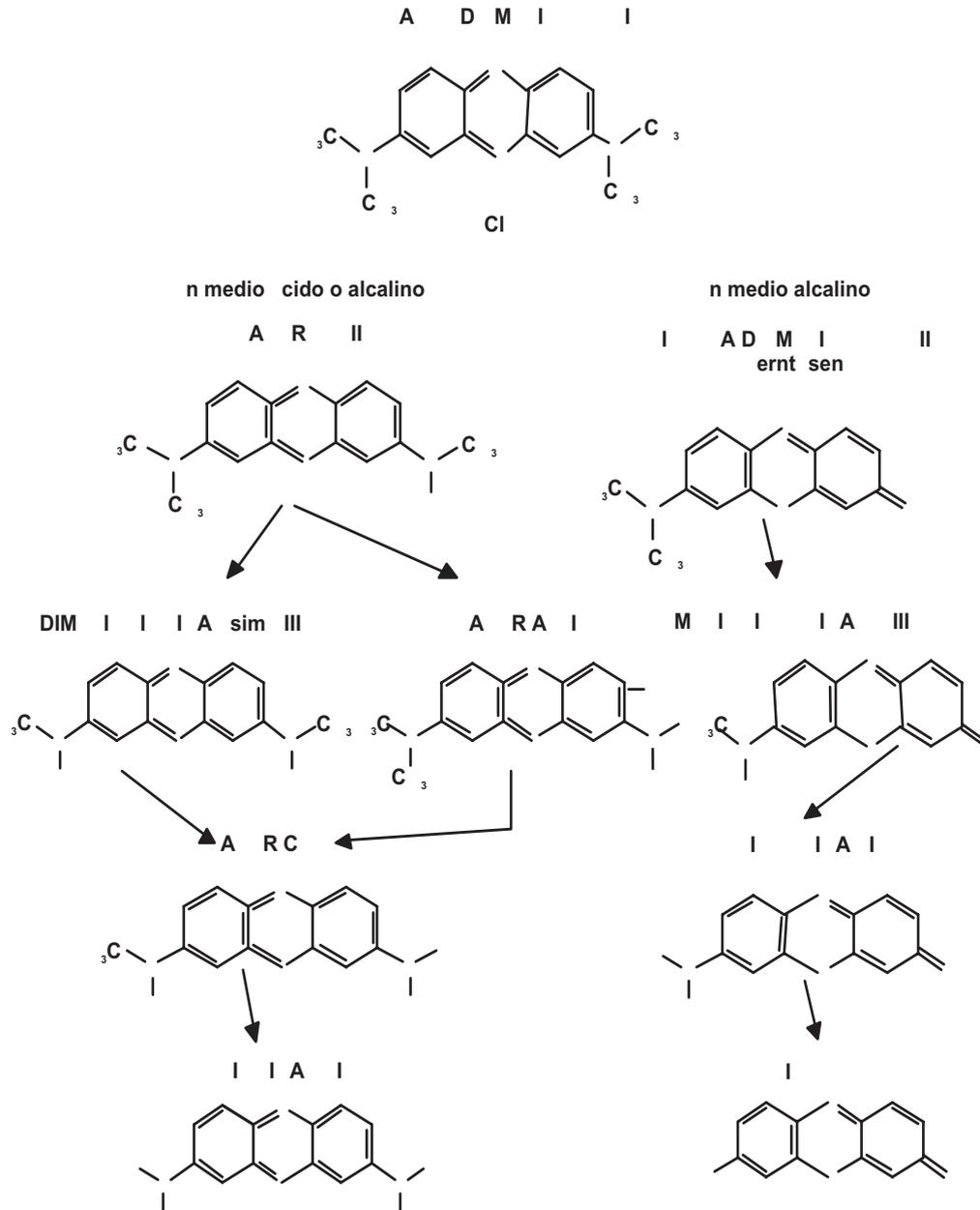


Figura 1. Oxidación del azul de metileno en medios ácido y alcalino.

informados para el colorante de Wright (36) dan menor cantidad de productos demetilados y un contenido de azul B y violeta de metileno junto al azul de metileno sin transformar con una relación de azul B/AM de 33,3 y 42,4 %, en dos muestras diferentes (20); otros productos de descom-

posición se encuentran en cantidades menores. El tetraborato de sodio (bórax), cuyas soluciones tienen un pH 9,5, que disminuye al calentar (42), informado por Sahli (6), Manson (27) y otros autores (78-83), da un azul policromo de excelente composición para la coloración de plasmodios,

como lo demostraron Donaldson y Lillie (84). Un resultado igualmente bueno obtuvo Fields (85) con el azul policromo preparado por Hitch mediante el fosfato disódico. Los métodos de oxidación extrema con adición de bases fuertes como es el peróxido de sodio (86) y el del clorato de potasio en medio alcalino (87) determinan una desviación a la derecha de la secuencia oxidativa y desaparición total del azul de metileno y acúmulo de tionolinas y tionol (figura 1, derecha) (36). El óxido de plata, a pesar de su bajísima solubilidad en el agua, sube significativamente el pH de la solución y se comporta como una base fuerte, pero si se siguen las instrucciones de Laveran (10) y las de otros (88-92), el azul policromo resultante (azul de Borrel) debe asimilarse al de Balch (cuadro 2). En condiciones de reacción más enérgicas, Bernthsen produjo principalmente violeta de metileno con el óxido de plata (7). También se ensayaron el óxido mercúrico amarillo (93) y la alúmina activada (21).

Durante la primera guerra mundial, la necesidad llevó a Stévenel, en Guayana Francesa, a usar como oxidante el permanganato de potasio (94); los autores que lo utilizaron posteriormente lo consideran excelente (95-102), pero no se han publicado análisis posteriores de los productos de oxidación. La acción del ozono (103) no puede considerarse por sí sola, pues el autor utilizó una solución básica. Igual comentario merece el método con sulfato de cobre amoniacal (104), pero la acción del colargol preparado según Crédé (105) es más difícil de explicar. Métodos físicos como

los rayos X (21) y la luz ultravioleta (106) son de interés teórico pero de aplicación práctica difícil.

Reseña biográfica de Giemsa

Berthold Gustav Carl Giemsa (figura 2) nació en Blechhammer, Alemania, el 20 de noviembre de 1867 y murió en Biberwier, Austria, el 10 de junio de 1948 (107). Fue un farmacéutico con estudios de postgrado en química, mineralogía y bacteriología. Tenía conocimiento de primera mano sobre enfermedades tropicales por haber permanecido en África oriental durante 3 años como boticario y químico oficial. Al regresar a Alemania complementó sus estudios en química orgánica y bioquímica en Berlín y entró a trabajar en el *Institut für Schiffs und Tropenkrankheiten* (Instituto para Enfermedades de la Marinería y Tropicales) de Hamburgo, dirigido por Bernhard Nocht. Giemsa preparó azul I, muy probablemente por el método de Simon, y desarrolló un colorante para los plasmodios en gota gruesa que constituye hasta el día de hoy el patrón comparativo para cualquier otro método de diagnóstico de la malaria (29,31,108). También realizó trabajos en quimioterapia con arsenicales para la sífilis, con derivados de la quinina y para la utilización del bismuto en terapéutica, pero su nombre se ha inmortalizado por el desarrollo de su colorante (14). El cuadro 3 detalla las publicaciones que hizo sobre este tema (109-121). En vida, Giemsa mereció opiniones críticas (122) sobre la forma en que publicó su trabajo, sin indicar cómo preparó el azul I, pero a su muerte, su discípulo Kirchmair

Cuadro 2. Análisis originales de azules II comerciales y azul de Balch.

Colorante	Contenido de colorante (%)	Azul de metileno (%)	Azur B (%)	Azur A (%)	Azur C (%)	Tionina (%)
Azur II Hollborn	45,8	63,8	30,5	4,22	0,74	0,74
Azur II Grubler	69,1	63,5	26	4,6	2,0	3,1
Giemsa (Allied)		64,3	20,2	11,4	2,2	0,7
Giemsa (Fisher)		65,8	21	10,1	2,2	1,0
Azul policromo (Balch)	47,7	48,9	33,4	6,5	4,1	7,2

Nota: el porcentaje relativo de azul B en el azul I era, por lo tanto, del 61% y 53,4%, quedando 31,9% y 31,75% de azul de metileno y resultando un 8,4% y un 9,2% de azul A, del que no se supo, por carecer de patrón adecuado, qué porcentaje de dimetiltionina simétrica contenía. La relación AzB/AM en estas muestras es de 29% y 32%. El bajo contenido de materia colorante de los azules II originales reduce la concentración real en la solución madre del colorante de Giemsa, 54% la muestra de Hollborn y 31% la muestra de Grubler. El azul de Balch fue obtenido de Harleco, Filadelfia, EE.UU.



Figura 2. Retrato de Berthold Gustav Carl Giemsa, obtenido del Instituto Bernhard-Nocht, Hamburgo, Alemania, y reproducido con su autorización. Cortesía de Martina-Christine Koschwitz, bibliotecóloga, Instituto Bernhard-Nocht.

publicó un extenso artículo sobre su colorante (123); en el centenario de su nacimiento se le dedicaron al menos seis notas necrológicas en la prensa científica: cuatro referenciadas por Nauck (107) y dos más recuperadas en Medline (124,125); en 1996 aparece otra biografía (126) que se une a la de Nauck en la enciclopedia biográfica de científicos alemanes (107). Su trabajo

se considera uno de los cinco más importantes del Instituto Bernhard Nocht entre 1900 y 1960 (127).

Colorante de Giemsa

En su primera publicación, Giemsa (12) enumera los trabajos previos realizados, cita el azul I, sin dar ninguna indicación del método de preparación utilizado, lo equipara con el rojo del azul de metileno de Nocht (2) e insiste repetidamente en que es puro. En el segundo artículo, publicado poco después (13), mezcla el azul I con igual cantidad de azul de metileno para mejorar los resultados, llama a esta mezcla azul II y añade eosina amarillenta potásica en relación estequiométrica, calculando el peso molecular del azul I como el de la sulfona, no de la trimetilnitronina, y añade nuevamente azul II. La mezcla final tiene azul II-eosina 0,6%, azul II 0,16% (27), con la cual se prepara la solución madre del colorante, para una concentración final del 0,8% en otra mezcla de 1 volumen de glicerol por 3 de metanol químicamente puros. Esta solución debe conservarse totalmente protegida del aire con el fin de evitar su hidratación, pues los dos solventes son higroscópicos, pero la recomendación general es la de comprar la solución madre ya preparada. La solución colorante final se realiza añadiendo dos o tres gotas de solución madre por dos mililitros de agua destilada, ajustando el pH a 6,8 para estudios de

Cuadro 3. Temas de trabajo de Giemsa con su colorante.

Año	Tema de la publicación	Referencia
1902	Coloración de parásitos de la malaria	12,13
1904	Simplificación y perfeccionamiento de su colorante	14
1905	Controversia con Marino sobre uso de azul policromo	26
1905	Tinción del <i>Treponema pallidum</i> Schaudinn	27
1907	Tinción del <i>Treponema pallidum</i> Schaudinn en extendidos	109
1909	Tinción de preparados microscópicos húmedos	110
1910	Tinción de extendidos y cortes con colorante de Giemsa	111
1910	Tinción de cortes con colorante de Giemsa	112
1910	Tinción rápida con el colorante de Giemsa	113
1910	Nueva tinción rápida con el colorante de Giemsa	114
1913	Aceite de parafina para sellar preparados húmedos de Giemsa	115
1914	Tinción rápida con colorante de Giemsa de extendidos secos	116
1922	La esencia de la coloración de Giemsa	117
1924	La práctica de la coloración de Giemsa	118
1934	Historia, teoría y avances de la coloración de Romanowsky	119
1935	Coloración de Romanowsky de protozoos en extendidos viejos	120
1935	Observaciones de mérito sobre los gránulos de Schuffner	121

hematológicos, o a 7,4 para la búsqueda de plasmodios. El tiempo de coloración debe prolongarse por 20 a 30 minutos o más en los casos del llamado Giemsa lento; el exceso de azul se puede eliminar lavando el preparado con agua destilada. Giemsa diseñó su colorante y su método de coloración para el diagnóstico microscópico de la malaria y para hacerlo más eficaz los preparados más útiles son la gota gruesa de sangre, a la cual quita la hemoglobina de los glóbulos rojos por medio de agua ('lacado' o hemólisis). La tinción de extendidos de sangre en capa delgada requiere fijación, que generalmente se realiza con metanol, para el estudio fino y la clasificación de las especies de *Plasmodium* o de la citología sanguínea. Poco después de las publicaciones de Giemsa, Pappenheim propuso (128) iniciar la tinción de los extendidos de sangre con el colorante de May y Grunwald (15), que actúa como fijador por estar disuelto en metanol, y es en todo equivalente al colorante de Jenner, e inicia la coloración que posteriormente se completa y afina con el colorante de Giemsa: es el método panóptico de excelentes imágenes en el estudio de los extendidos de sangre para observación personal (129) y de aspirados de médula ósea o mielograma (130) (cuadro 2) (131).

Fue tal el éxito del colorante de Giemsa que ya en 1913 Langeron, principal tratadista francés en microscopía, optó por suprimir en la segunda edición de su Manual (132) la descripción del método de Borrel para preparar el azul oxidando azul de metileno con óxido de plata (11) y recomendar el uso del colorante de Giemsa.

Durante la primera guerra mundial (1914-1918), se demostró la dependencia en el suministro de colorantes biológicos de la industria alemana, la cual se estima que proveía el 88% de los colorantes de síntesis utilizados a nivel mundial (133). Para usos de laboratorio clínico, el colorante de Giemsa constituía prácticamente un monopolio de los fabricantes alemanes que contaban con el control de calidad de las firmas Grubler y Hollborn. Durante dicha guerra se realizaron ensayos para sustituir el Giemsa, que no se obtenía en el mercado, realizando ensayos originales como los de oxidación directa ya indicados y, al concluir la

guerra, Langeron, en la tercera edición de su Manual (134), vuelve a incluir la descripción detallada de la preparación del azul de Borrel, que se debía asemejar mucho al azul de Balch preparado en los EE.UU., cuya composición aparece en el cuadro 2.

Durante los siguientes años se mantuvo el interés para buscar alternativas al colorante de Giemsa pero fue menor, pues ya se había reanudado el suministro de los colorantes alemanes. Giemsa se favoreció al no haber patentado su procedimiento, que en caso de ser una variante del método de Simon no cumplía el criterio de las patentes químicas en Alemania para reconocerle el hallazgo. La incautación de todas las patentes alemanas luego del Tratado de Versalles, legitimó la actitud de Giemsa.

Wittekind y su grupo propusieron el azul B para reemplazar al azul II de Giemsa en las coloraciones de sangre (135) sin tomar en cuenta, al igual que Marshall (136), la tinción de los plasmodios y otros hemoparásitos. Como consecuencia de esta propuesta, se formalizó una norma de la ICSH (137) recomendando el azul B y la eosina amarillenta como coloración para citología sanguínea.

Mecanismo de la coloración de Giemsa

El azul B con la eosina, unidos a nivel de la cromatina del plasmodio o de otros protozoarios, dan un color rojo al núcleo; el citoplasma toma el color del azul de metileno: es el 'efecto' Romanowsky en sentido estricto (figura 3a). En sentido ampliado, los autores contemporáneos amplían el término 'efecto' al color violeta rojizo nuclear de células sanguíneas y de médula ósea teñidas con el colorante de Giemsa (figura 3b): éste señaló (117) que su azul I se uniría a los radicales fosfato del ADN, entonces llamado ácido timonucleico, y que la eosina actúa como mordiente. Los factores que determinan este efecto, de acuerdo con el buen resumen de Woronzoff-Dashkoff (2), son los planteados por Wittekind y coautores, al igual que Marshall, quienes proponen que los colorantes interactúan con la cadena de ADN y entre sí. Wittekind considera que el colorante que primero se liga es el azul B. Marshall (137) y otros (138,139) dan

importancia únicamente al azul B pero no proponen ninguna explicación para el color rojizo de la cromatina del plasmodio teñido con el colorante de Giemsa y los derivados del método de Romanowsky, que difiere a simple vista del violáceo purpúreo de los núcleos de ciertas células hemáticas, pues sus publicaciones no mencionan tinciones de plasmodios.

Perspectiva actual

Al contrario de los nombres de investigadores de igual o mayor mérito, como es Lillie, el de Giemsa permanece incólume en la literatura médica y científica. La búsqueda 'Giemsa' por Medline arroja un total de 3.694 publicaciones entre 1970 y el 31 de diciembre del 2002 y clasificadas después de la automatización electrónica del sistema. La ampliación de la búsqueda por ese sistema cubre

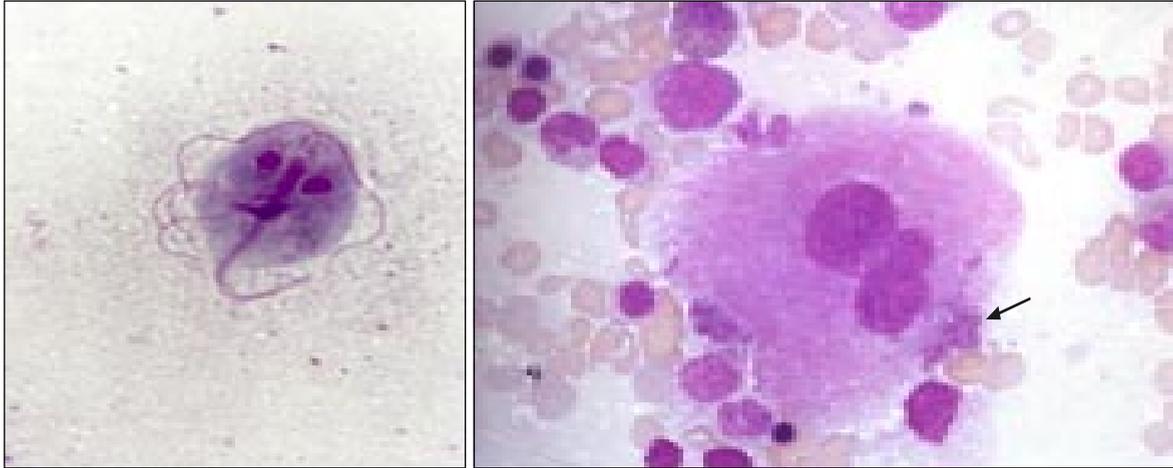
los resúmenes y textos de los artículos en que se utilizó el colorante o en que se hace referencia al mismo Giemsa y sus estudios (cuadro 4).

En contraste con el buen número de trabajos con células sanguíneas, sólo 14 están clasificadas como pertinentes a «hematología» paradoja explicada por el uso de los sistemas automatizados de recuentos globulares sanguíneos y de los diferentes tipos de leucocitos (leucograma o fórmula leucocitaria) que han relegado a último término en la práctica (140) el interés investigativo sobre los colorantes de las células sanguíneas como métodos de estudio: hay amplia oferta de equipos automatizados en el comercio y la indicación de los fabricantes es usar sólo los colorantes que ellos proveen y para los cuales han calibrado sus equipos (141).

Cuadro 4. Usos actuales del colorante de Giemsa.

Área de estudio	Temas específicos	Referencias en Medline 1970-2002	
Citología		1.975	
	Células madres		135
	Células sanguíneas		777
	Leucocitos		648
	Medula ósea, células		17
	Hemocitoblasto		4
	Megacariocito		118
	Citodiagnóstico		30
Genética		895	373
	Cromosomas		1.147
	Bandas cromosomas		39
	id con Giemsa-11*		5
Patología		1.058	211
	Biopsias		1.166
Microbiología	Leucemia		256
	Virus	532	121
	<i>Chlamydia</i>		97
	Bacteria		676
	<i>Pneumocystis carinii</i>		84
	<i>Helicobacter pylori</i>		278
	<i>Borrelia</i>		16
	<i>Legionella</i>		4
	<i>Treponema</i> sp.		2
	Parasitología		329
<i>Toxoplasma gondii</i>			26
<i>Leishmania</i> sp.			61
Micología	<i>Plasmodium</i> sp.		134
		529	

Nota: el número de referencias del área de estudio no guarda necesariamente relación con el número de referencias sobre los temas específicos dentro de cada área.



3a.

3b.

Figura 3a. Trofozoíto de *Giardia duodenalis* teñido con coloración de Giemsa. 1000X. Obsérvese que los núcleos toman un color rojizo, ocasionado por la unión del azul B con la eosina a nivel de la cromatina, mientras el citoplasma toma el color del azul de metileno. Este es el denominado “efecto Romanowsky” (cortesía del Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud). **3b.** Megacariocito en extendido de médula ósea humana teñido con la coloración panóptica de Pappenheim (May-Grunwald-Giemsa). Aumento 1.000X, con ampliación fotográfica posterior. Obsérvese el color violeta rojizo de los núcleos del megacariocito y de las células que lo rodean. El color se debe a la unión del azul I con los radicales fosfato del ADN. La flecha señala un grupo de plaquetas segregadas del megacariocito (cortesía de la doctora Alicia Gaitán Cortés de Perea, Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia).

Tzanck (142) desarrolló un método de citodiagnóstico inmediato mediante la coloración de extendidos o impresiones por el método panóptico de Pappenheim (128) o May-Grunwald-Giemsa que se sigue utilizando (129) (figura 2). El área de la genética es la del mayor número de comunicaciones en la que se utilizó el colorante de Giemsa después de diversos tratamientos previos al material de estudio. El uso de colorantes fluorescentes permite comparar las bandas obtenidas con los dos métodos. En el llamado Giemsa-11 (143), la solución del colorante en tampón fosfato se ajusta a un pH final de 11,6 añadiendo solución de soda cáustica. Esta mezcla fue utilizada inicialmente para demostrar la heterocromatina densa del cromosoma 9 y posteriormente se ha generalizado.

Al pH utilizado se establecen condiciones similares a las que obtuvo Giemsa al añadir carbonato de potasio para la tinción de *Treponema pallidum* Schaudinn y se generan derivados de la tionolína, principalmente el violeta de metileno. Hay un total de 1.028 citas de Giemsa-11.

La tinción de cortes histológicos fue una de las áreas iniciales de trabajo con el azul de metileno oxidado y la eosina (144). Giemsa indicó el uso de su colorante para cortes (111,112), otros autores usaron sistemáticamente el azul II en histología y embriología (145). En el momento actual, la coloración de Giemsa se utiliza para teñir biopsias del más variado origen y, entre nosotros, las de mucosa gástrica para teñir y detectar la presencia de *Helicobacter pylori*. El uso inicial de esta coloración como rutina no prueba la ausencia de dicha bacteria, pero sólo estos negativos ameritan el estudio con métodos más precisos pero más complejos y costosos.

El colorante de Giemsa sigue teniendo un gran uso en la búsqueda de *Plasmodium* en sangre: el método en gota gruesa es el patrón de comparación de los métodos de fluorescencia e inmunofluorescencia y de los múltiples colorantes comerciales (146). El método panóptico es muy conveniente para observar no sólo la citología sanguínea sino también la presencia eventual de hemoparásitos.

Comentarios

La multiplicidad de métodos para preparar azul de metileno policromo, al igual que los numerosos métodos propuestos para reemplazar el colorante de Giemsa, muestran las dificultades para utilizarlo y sólo deberían considerarse sus equivalentes los que se hacen con azul de metileno policromo por oxidación en ácido. Los métodos que utilizan policromos preparados en medio alcalino no lo serían en sentido estricto.

Discombe propuso (147) que toda publicación que incluya coloraciones de sangre debería incluir el origen y el número de lote del colorante del fabricante; en realidad, el ideal sería incluir el análisis porcentual de las sustancias contenidas en la mezcla, pero esto no resulta práctico y menos para soluciones que cambian al actuar. Una alternativa sería la mezcla de colorantes de alta pureza disponibles en la actualidad sin un sobrecosto exagerado. Este sistema ya fue propuesto por varios autores con colorantes menos homogéneos (148-150).

Agradecimientos

Al doctor Santiago Nicholls, editor de Biomédica, quien acogió mi idea de escribir esta revisión a la cual ha aportado enmiendas fundamentales para hacerla más eficaz y modificaciones que han mejorado su presentación sustancialmente. Al doctor Gerzaín Rodríguez Toro por facilitarnos generosamente las dos muestras de azul II de Grubler y Hollborn. A la doctora Woronzoff-Dashkoff por recibirlas y enviarlas al laboratorio de la *Food and Drug Administration* en Denver, Colorado, EE.UU., y remitirnos los resultados. A los doctores José Roybal y Sherri Turnipseed por realizar los análisis del cuadro III. A la química Ingrid Herrera Garnica por el dibujo y composición de la figura I.

Bibliografía

1. **Laveran A.** Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre. CR Acad Sc 1880;92:1268.
2. **Woronzoff-Dashkoff KPK.** The Ehrlich-Chenzinsky-Plehn-Malachowski-Romanowsky-Nocht-Jenner-May-Grunwald-Leishman-Reuter-Wright-Giemsa-Lillie-Roe-Wilcox stain. Clin Lab Med 1993;13:759-71.
3. **Society of Dyers and Colourists.** Colour Index. Third edition. Bradford and London: Lund, Humphries; 1971. p.4470.
4. **Koch R.** Der Aetiologie der Tuberkulose. Berliner Klin Wochenschr 1882;19:221-30.
5. **Loeffler F.** Die Klebs´chen Staebchen. Mittel Kaiserl Gesundheitsamt 1884;421. En: Breed RS, editor. Bergey´s manual of determinative bacteriology. Seventh edition. Baltimore: Williams & Wilkins; 1957.
6. **Sahli H.** Ueber die Anwendung von Boraxmethylenblau fur die Untersuchung des centralen Nervensystems und fur die Nachweis von Mikroorganismen, speziell fur bakteriologischen Untersuchung der nervosen Centralorgans. Z Wiss Mikrosk 1885;2:49-51.
7. **Bernthsen A.** Studien in der Methylenblaugruppe. Liebigs Ann Chem 1885;230:73-211.
8. **Unna PG.** Uber die Reifung unserer Farbstoffen. Z Wiss Mikrosk 1891;8:475-87.
9. **Bremer L.** Ueber das Paranuklearkoerpechen der gekernten Erythrocyten, nebst Bemerkungen ueber den Bau der Erythrocyten im Allgemeinen. Arch Mikrosk Anat 1895;45:433-50.
10. **Jenner L.** A new preparation for rapidly fixing and staining blood. Lancet 1899;1:370-1.
11. **Laveran A.** Sur un procédé de coloration des noyaux des hématozoaires endoglobulaires des oiseaux. CR Soc Biol 1899;51:249-52.
12. **Leishman WB.** The application of Romanowsky stain in malaria. Brit Med J 1901;1:635-7.
13. **Reuter K.** Ueber den farbenden Bestandteil der Romanowsky Nochtschen Malaria plasmodienfarbung. Eine Reindarstellung und praktische Verwendung. Zentralbl Bakteriol 1. 1901;30:248-56.
14. **Lazear JW.** Structure of the malarial parasite. Johns Hopkins Hosp Rep 1901;10:2-9.
15. **May R, Grunwald L.** Ueber Blutfarbungen. Zentralbl Inn Med 1902;23:265-70.
16. **Wright JH.** A rapid method for the differential staining of blood films and malarial parasites. J Med Res (Boston) 1902;7:138-44.
17. **Giemsa G.** Farbenmethoden fur Malariaparasiten. Zentralbl Bakteriol 1. 1902;31:429-30.
18. **Giemsa G.** Farbenmethoden fur Malariaparasiten. Zentralbl Bakteriol 1. 1902;32:307-13.
19. **Giemsa G.** Eine Vereinfachung und Vervollkommung meiner Methylenazur-Methylenblau-Eosin Farbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nochtsen Chromatinfarbung. Zentralbl Bakteriol 1. 1904;37:308-11.
20. **Lubrano GJ, Dean WW, Heinsohn HG, Stastny M.** The analysis of some commercial dyes and

- Romanowsky stains by high performance liquid chromatography. *Stain Technol* 1977;52:13-23.
21. **Stenstrom W, Street HR.** Effects of X-rays on methylene blue and on thiomethylthionine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1935;32:1498-500.
 22. **Marshall PN, Lewis SM.** The purification of methylene blue and azure B by solvent extraction and crystallisation. *Stain Technol* 1975;50:375-81.
 23. **Ehrlich P.** Uber das Methylenblau und seine klinische bakterioskopische Verwertung. *Klin Med* 1881;2:710-3.
 24. **Kehrmann F, Duttenhofer A.** Ueber Methylenazur. *Ber Dtsch Chem Ges* 1906;39:1403-8.
 25. **Lillie RD.** Studies on polychrome methylene blue. II. Acid methods of polychroming. *Stain Technol* 1942;17:97-110.
 26. **Lillie RD.** Studies on polychrome methylene blue. III. Alkali methods of polychroming. *Stain Technol* 1943;18:1-11.
 27. **Langeron M.** Précis de microscopie. 7ème. ed. Masson, Paris, 1947. p. 590.
 28. **MacNeal WJ, Killian JA.** Chemical studies on polychrome methylene blue. *J Am Chem Soc* 1926;48:740-7.
 29. **Lillie RD.** A Giemsa staining of quite constant composition and performance, made in the laboratory from eosin and methylene blue. *Public Health Rep* 1943;58:449-52.
 30. **Singh J, Bhattarchaji LM.** Rapid staining of malaria parasites by a water soluble stain. *Indian Med Gaz* 1944;79:102-4.
 31. **Gautam AS, Sharma RC, Bhatt RM, Gupta DK.** JSB versus Giemsa stain: an evaluation. *Indian J Malar* 1992;29:251-3.
 32. **Russo A, Donaldson PT, Lillie RD.** Lower azure B methylene blue ratios in Giemsa type blood and malaria stains. *Stain Technol* 1978;53:37-41.
 33. **Lillie RD.** A note on Giemsa stains. *Am J Trop Med* 1949;29:625.
 34. **Marshall PN, Lewis SM.** A rapid thin layer chromatographic system for Romanowsky blood stains. *Stain Technol* 1974;49:235-40.
 35. **Marshall PN, Lewis SM.** Batch variations in commercial dyes employed for Romanowsky-type staining: a thin layer chromatographic study. *Stain Technol* 1974;49:351-8.
 36. **Marshall PN.** Romanowsky-type stains in haematology. *Histochem J* 1978;10:1-29.
 37. **Giemsa G.** Bemerkungen zur Färbung der *Spirochaeta pallida* (Schaudinn). *Dtsch Med Wochenschr* 1905;31:1026-7.
 38. **Manwell RD.** The J.S.B. stain for blood parasites. *J Lab Clin Med* 1945;30:1078-82.
 39. **Manwell RD, Feilgelson P.** A modified method of preparing the J.S.B. stain. *J Lab Clin Med* 1948;33:777-82.
 40. **Bami HL, Nair CP.** Composition of J.S.B. stain and factors influencing its quality. *Stain Technol* 1955;30:261-8.
 41. **Vergara F.** Como logré colorar el hematazoario de Laveran valiéndome del azul de metileno ordinario. *Mem Soc Cient Antonio Alzate* 1919;37:397-9.
 42. **Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE.** The Merck index. Xlth edition. Rahway: Merck Co.;1979. p.113, 1213, 1359.
 43. **Scott RE, French RW.** Standardization of biological stains II. Methylene blue. *Military Surg* 1924;55:337-52.
 44. **Giemsa G.** Coloration des protozoaires. *Ann Inst Pasteur* 1905;19:346-50.
 45. **Marino F.** Au sujet de la coloration des protozoaires. Réponse à l'article ci-dessus de M. G. Gliemsa. *Ann Inst Pasteur* 1905;19:351-2.
 46. **Marino F.** Coloration des protozoaires et observations sur la neutrophilie de leurs noyaux. *Ann Inst Pasteur* 1904;18:761-6.
 47. **MacNeal WJ.** A rapid and simple method of staining *Spirochaeta pallida*. *JAMA* 1907;48:609-10.
 48. **Hanna W.** A modification of the Romanowsky-Ruge method of staining the *Plasmodium* of malaria. *Lancet* 1901;1:1010.
 49. **Mandelbaum M.** Ein vitale Färbung der *Spirochaeta pallida*. *Munch Med Wochenschr* 1907;54:2268-9.
 50. **Schuffner W.** Eine einfache Färbung der Leukocyten in der Zahlkammer mit Differenzierung der einzelnen Zellarten. *Munch Med Wochenschr* 1911;58:27.
 51. **Bruckner J.** Une modification pratique du procédé de Romanowsky pour le sang et tréponème. *CR Soc Biol* 1908;64:968-9.
 52. **McJunkin FA.** A polychrome stain with advantages over the Giemsa. *JAMA* 1915;65:2164-5.
 53. **Beck FA.** Method of preparing the eosinate of methylene blue and method for staining. *JAMA* 1918;71:1651.
 54. **Barlow DL.** A simplified method of preparing a modified Romanowsky blood stain. *Med J Austral* 1923;11:90.
 55. **Michelson L.** An improved methylene blue eosinate. *J Lab Clin Med* 1942;27:552-3.
 56. **Ezzat HG.** A modified procedure for the preparation of Romanowsky stain. *Med Lab Sci* 1987;44:86.
 57. **Tribondeau L, Dubreuil J.** Nouveaux colorants pour microscopie dérivés du bleu de méthylène. *CR Acad Sci* 1917;164:551-3.
 58. **Grosso G.** Colorazioni panoptiche e ad allettività microchimica nell'ematologia e nella tecnica istologica. *Pathologica* 1918;10:163-5.

59. **Fortner H.** Einiges zur Färbung mit Methylenblau-Ammoniakgemischen. *Z Wiss Mikrosk* 1927;44:165-72.
60. **Mayoral P.** Las tinciones pancrómicas del laboratorio de higiene de Nariño. *Med Cir* 1942;9:11-42.
61. **Hastings TW.** A method of preparing a permanent Nocht stain (Nocht-Jenner stain). *J Exp Med* 1905;7:265-79.
62. **Billet A.** Modification à la méthode de coloration de Romanowsky-Giemsa. *CR Soc Biol* 1906;61:753-4.
63. **Cropper J.** Rapid diagnosis of malaria. *Brit Med J* 1912; (I):891.
64. **Carageorgiades H.** Deux colorants neutres pour la méthode panoptique, de préparation facile et rapide. *C R Soc Biol* 1918;81:925-8.
65. **Cretin A.** Procédé de préparation et mode d'utilisation du polyéosinate de bleu de méthylène et de ses dérivés. *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 1920;36:1320-3.
66. **Puntoni V.** La preparazione dell'Azur di metilene ed il suo uso per la colorazioni alla Romanowsky. *Ann Ig* 1926;36:24-30.
67. **McNamara WL.** Giemsa stain for tissue. Rapid method. *J Lab Clin Med* 1933;18:752.
68. **Jerace F.** La colorazione alla Romanowsky con il liquido de Puntoni. *Ann Ig* 1938;48:606-7.
69. **Harris HF.** A modification of the Romanowsky stain. *Zentralbl Bakteriol* 1. 1903;34:188-91.
70. **Terry BT.** Increasing the pathologist's usefulness and his rewards. With directions for preparation and use of a polychrome methylene blue stain for frozen sections. *JAMA* 1920;74:1775-7.
71. **Assmann G.** Eosin-methylene blue and eosin-methylene azul for staining blood smears. *Munch Med Wochenschr* 1926;73:2210.
72. **Urtubey A.** Nota sobre un procedimiento sencillo, rápido y seguro para preparar la tintura de Romanowsky-Leishman. *Rev San Mil* 1906;20:517-9.
73. **Goodpasture EW.** An acid polychrome methylene blue solution for routine and special staining. *JAMA* 1917; 68:998.
74. **Roques H, Jude A.** Nouveau procédé de préparation du polyéosinate de méthylène. *Bull Soc Hist Nat Afrique du Nord* 1940;31:142-6.
75. **Goldhorn LB.** Method for polychroming methylene blue. *NY Univ Bull Med Sc* 1901;1:57-69.
76. **Wilson TM.** On the chemistry and staining properties of certain derivatives of the methylene blue group when combined with eosin. *J Exp Med* 1907;9:645-70.
77. **Emmel VM, Cowdry EV.** Laboratory technique in biology and medicine. Baltimore: Williams & Wilkins; 1964. p.359.
78. **Russell FF.** A combined staining method for malarial parasites and blood smears. *JAMA* 1915;64:2131-2.
79. **Sénevet G.** Note sur un procédé de coloration de l'hématozoaire du paludisme. *Bull Soc Path Exot* 1917; 10:540-2.
80. **Goubault MA.** Mode de préparation et mode d'éosinate de méthylène. Le «Pancolore». *Rev Path Comp* 1918; 18:118-9.
81. **Arnaud R.** Note sur une nouvelle méthode panoptique rapide de coloration du sang et des parasites dans les frottis. *CR Soc Biol* 1919;82:208-9.
82. **Goldie H.** Notes sur la coloration du sang et de hémoparasites. *Bull Soc Path Exot* 1933;26:461-4.
83. **Joannides G.** A simple method of staining malarial parasites. *J Lab Clin Med* 1947;32:89.
84. **Donaldson PT, Russo A, Reynolds D, Lillie RD.** Borax methylene blue: a spectroscopic and staining study. *Stain Technol* 1978;53:225-7.
85. **Field JW.** Further note on a method of staining malarial parasites in thick blood films. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1941;35:35-42.
86. **Proescher F, Krueger AP.** A simple and rapid method for the preparation of polychrome methylene blue and thiazine red. A rapid method for staining frozen sections with thiazine red. *J Lab Clin Med* 1924;10:153-9.
87. **Tzung CY.** Methylene violet (Berntsen) by the zinc-alkali-chlorate hydrolysis of methylene blue. *Stain Technol* 1964; 39:351-8.
88. **Gauducheau A.** Mélange colorant pour remplacer le Giemsa. *Bull Soc Med-Chir Indochine* 1916;7:301-5.
89. **Shortt HE.** Note on Romanowsky staining. *Indian J Med Res* 1918;6:124-6.
90. **Tribondeau L.** Sur la recherche de l'hématozoaire de Laveran. *Bull Soc Path Exot* 1918;11:196-205.
91. **Motais F.** Nouvel éosinate de méthylène. *Bull Soc Path Exot* 1920;13:206-8.
92. **Suldey EW.** Procédé simple de préparation d'un éosinate de bleu de Borrel pour les colorations hématologiques. *Bull Soc Path Exot* 1920;13:205-6.
93. **Bahrami A.** Un colorant de remplacement du Giemsa. *Bull Soc Path Exot* 1947;40:110-1.
94. **Stévenel L.** Le bleu au permanganate de potasse. *Bull Soc Path Exot* 1918;11:870.
95. **Zottner G.** Coloration du sang et des hématozoaires par la méthode de Stévenel modifiée. *CR Soc Biol* 1932; 111:423-4.
96. **Cerrutti C.** Contributo allo studio dei metodo di colorazione di Stévenel modificado du Zottner. *Arch Ital Sci Med Colon* 1933;14:194-200.
97. **Boyé R.** Méthode de coloration extra-rapide des hématozoaires du paludisme par le Romanowsky simplifié au bleu de Stévenel éosine en 2 temps. *Bull Soc Path Exot* 1940;33:248-52.

98. **Simeons ATW.** Economy and simplification in the staining of blood slides. *Indian Med Gaz* 1942;77:725-9.
99. **Chernoff AH.** A rapid staining technique for the malarial parasites. *Military Surg* 1943;93:480-1.
100. **Van Scyoc GP.** Modified rapid staining technic for malaria. *Hosp Corps Quart* 1945;18:47-8.
101. **Bhattarchaji LM, Singh J, Sen Gupta GP.** A simple methylene blue-eosin substitute for Leishman and Giemsa stains. *Indian Med Gaz* 1946;81:400-1.
102. **Angulo Ramos G.** El colorante de Stévenel para sangre. *Laboratorio* 1948;6:27-31.
103. **Puntoni V.** La préparation de l'azur de méthylène au moyen de l'ozone et son emploi pour les colorations par la méthode de Romanowsky. *CR Soc Biol* 1926;94:21-3.
104. **Kuhn C.** Un nouveau colorant. *Le Sang* 1933;7:758-60.
105. **Koreck J.** Zur Farbetechnik der Malariaparasiten. *Dtsch Med Wochenschr* 1903;79:300-1.
106. **Marie SU, Raleigh JT.** The use of ultraviolet rays for the polychromatization of methylene blue. *J Lab Clin Med* 1924;10:250.
107. **Nauck EG.** Giemsa Berthold Gustav Carl, im Neue Deutsche Biographie Herausgegeben von der historische Kommission bei der Bayerischen Akademie der Wissenschaften, VI band. Ducker, Humblot, Berlin; 1964. p.371-2.
108. **Pividal Grana J, Machín Sánchez R, Fachado Carvajales A.** Comparación simultánea de los colorantes naranja de acridina y Giemsa en el diagnóstico del paludismo. *Rev Cubana Med Trop* 1986;38:289-95.
109. **Giemsa G.** Beitrag zur Färbung der *Spirochaeta pallida* (Schaudinn) in Austrichpreparaten. *Dtsch Med Wochenschr* 1907;33:676-9.
110. **Giemsa G.** Ueber die Färbung von Feuchtpräparaten mit meiner Azur-Eosinmethode. *Dtsch Med Wochenschr* 1909;35:1751-2.
111. **Giemsa G.** Zur Färbung von Feuchtpräparaten und Schnitten mittels der Azureosinmethode. *Zentralbl Bakteriologie* 1. 1910;54:489-90.
112. **Giemsa G.** Ueber die Färbung von Schnitten mittels Azur-Eosine. *Dtsch Med Wochenschr* 1910;36:552-3.
113. **Giemsa G.** Ueber eine neue Schnellfärbung mit meiner Azur-Eosinlösung. *Arch Schiff Tropenhyg* 1910;14:695-96.
114. **Giemsa G.** Ueber eine neue Schnellfärbung mit meiner Azur-Eosinlösung. *Munch Med Wochenschr* 1910;57:2476.
115. **Giemsa G.** Paraffinoel als Einschlußmittel für Romanowsky Präparate und als Konservierung-sflüssigkeit für ungefärbte Trockenaustriebe. *Zentralbl Bakteriologie* I. 1913;70:444-6.
116. **Giemsa G.** Zur Schnellfärbung (Romanowsky-Färbung) von trocken Austrichen. *Zentralbl Bakteriologie* 1. 1914; 73:493-6.
117. **Giemsa G.** Das Wesen des Giemsa Färbung. *Zentralbl Bakteriologie* 1. 1922-3;89: 99-106.
118. **Giemsa G.** Zur Praxis der Giemsa Färbung. *Zentralbl Bakteriologie* 1. 1924;91:343-6.
119. **Giemsa G.** Geschichte, Theorie und Weiterentwicklung der Romanowsky Färbung. *Med Welt* 1934;8:1432-4.
120. **Giemsa G.** Die Romanowsky Färbung protozoischer Blutparasiten in alten Trockenaustriechen. *Zentralbl Bakteriologie* 1935;134:483-6.
121. **Giemsa G.** Ueber eine bemerkenswerte Fehlerquelle bei der farberischen Darstellung der Schuffner-Tupfelung. *Munch Med Wochenschr* 1935;82:1075-6.
122. **Conn HJ.** *Biological stains*, 7th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1961.
123. **Kirchmair H.** Die Giemsa-Färbung (Azur-Methylenblau-Eosin Färbung). *Forsch u Forscher Tiroler Arztchule* 1950;2:107-31.
124. **Editor.** Gustav Giemsa (1867-1948). *Triangle* 1967;8:1.
125. **Vogel H.** Gustav Giemsa (1867-1948). *Z Tropenmed Parasitol* 1967;18:386.
126. **Jonecko A.** Gustav Giemsa (1867-1948) his universal method of microscopic dyeing and his contribution for tropical medicine and chemotherapy. *Arch Hist Filoz Med* 1996;59:31-40.
127. **Mannweiler E.** The scientific accomplishments of coworkers in the Bernhard Nocht Institut between 1900-1960. *Zentralbl Hyg Unweldmed* 1991;192:187-206.
128. **Pappenheim A.** Panoptische Universal-färbung für Blutpräparate. *Med Klin* 1908;4:1244.
129. **Benattar L, Flandrin G.** Morphometric and quality control for a May-Grunwald-Giemsa stained preparation. A 40 center cooperative study. *Leuk Lymphoma* 1999; 33:587-91.
130. **Kass L.** Interpretation of bone marrow aspirates and biopsies. En: Bick RL, editor. *Hematology clinical and laboratory procedures*. St Louis: Mosby; 1993.
131. **Roybal JE, Munns RK, Holland DC, Hurlbut JA, Long RA.** Application of electrochemical and UV/visible detection to the LC separation and determination of methylene blue and its demethylated metabolites from milk. In: Agarwal VK, editor. *Analysis of antibiotic drug residues in food products of animal origin*. New York: Plenum; 1992.
132. **Langeron M.** *Précis de microscopie*. 2^{ème} ed. Paris: Masson; 1913.

133. **Delamare F, Guineau B.** Los colores, historia de los pigmentos y colorantes. Barcelona: BSA; 2000.
134. **Langeron M.** Précis de microscopie. 3ème ed. Paris: Masson; 1921.
135. **Wittekind D, Kretschmer V, Sohmer J.** Azure B-eosin Y stain as the standard Romanowsky-GIEMSA stain. Brit J Haematol 1982;51:391-3.
136. **Marshall PN.** Methylene blue-azure B-eosin as a substitute for May-Grunwald-Giemsa and Jenner-Giemsa stains. Microscopica Acta 1977;79:153-6.
137. **International Committee for Standardization in Haematology.** ICSH reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y (Romanowsky stain). Brit J Haematol 1984;57:707-10.
138. **Wyandt HE, Wysham DG, Minden SK, Anderson RS, Hecht F.** Mechanisms of Giemsa banding of chromosomes. 1. Giemsa-11 banding with azure and eosin. Exp Cell Res 1976;102:85-94.
139. **Curtis DJ, Horobin RW.** Staining banded human chromosomes with Romanowsky dyes; some practical consequences of the nature of the stain. Human Gen 1975;26:99-104.
140. **Pierre RV.** Peripheral blood film review. The demise of the eyecount leukocyte differential. Clin Lab Med 2002; 22:279-97.
141. **Gilliland JW, Rogers CH, Sage BH.** Blood stain for automatic differential analysis of leukocytes. Clin Lab Products 1974;3:2-8.
142. **Tzanck A, Aron-Brunetiere R.** Le cyto-diagnostic immédiat. Sem Hop 1949;3973-3980.
143. **Gagne R, Laberge C.** Specific cytological recognition of the heterochromatic segment of number 9 chromosome in man. Exptl Cell Res 1972;73:239-42.
144. **Sternberg C.** Eine Schnitffärbung nach der Romanowskyschen Methode. Zentralbl Allg Pathol 1905; 16:293-4.
145. **Von Prowazek S.** Zur Kenntnis der Giemsa-Färbung von Standpunkt der Zytologie. Z Mikrosk 1914;31:1-16.
146. **Collier JA, Longmore JM.** The reliability of the microscopic diagnosis of malaria in the field and in the laboratory. Ann Trop Med Parasitol 1983;77:113-7.
147. **Discombe G.** Application des méthodes cytologiques modernes aux travaux de laboratoire clinique. Rev Hematol 1950;5:565-79.
148. **Hollande AC.** Solution colorante à base d'éosinate d'azur et de violet de méthylène. CR Soc Biol 1916; 79:746-8.
149. **MacNeal WJ.** Tetrachrome blood stain: an economical and satisfactory imitation of Leishman's stain. JAMA 1922;78:1122-3.
150. **Léger A.** Mode de préparation simplifiée d'un éosinate de méthylène. Bull Soc Path Exot 1925;18:464-5.

Fe de erratas

Biomédica
2003;23:5-18

Cien años del colorante de Giemsa

José Perea-Sasiaín

Laboratorio de Microscopía, Sección de Biología Celular, Departamento de Morfología,
Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

This is a general review of work previous and subsequent to Giemsa stain, emphasizing methylene blue polychromes. A short biographical sketch of Giemsa is presented, as well as of the constitution and mechanism of action of his stain and unique HPLC analyses of his azur II (methylene blue 63.6%, azur B 28.6%, azur A 4.4%, azur C 1.4%, thionin 1.9%): azur I was not "pure", it is a mixture of thionin and all of its 3 and 7 N-methylated derivatives prepared most probably by acid oxidation as clarified by Lillie. Uses of Giemsa stain reported during the last 32 years are tabulated.

Key words: Giemsa, azure, methylene blue, polychrome methylene blue.



Aclaración de los autores

Biomédica
2003;23:5-18

Cien años del colorante de Giemsa

José Perea-Sasiaín

Laboratorio de Microscopía, Sección de Biología Celular, Departamento de Morfología,
Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

En las fórmulas esquemáticas de la figura 1 la unión del anillo heterocíclico central con el anillo bencénico izquierdo de los azures A, B Y C tiene una sola línea.



Aclaración de los autores

Biomédica
2003;23:263-73

Identificación de antígenos de aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis* reconocidos por IgG total y subclases

Jenny Fabiola Hernández ¹, Sofía Duque ^{1,2}, Adriana Arévalo ¹,
Rafael Guerrero ³, Rubén Santiago Nicholls ^{1,2}

¹ Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

² Unidad de Parasitología, Departamento de Salud Pública y Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

³ Gastroenterología Pediátrica, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

Reproducido con autorización de la revista *Médica Sánitas* 2003;6(3):26-50.