
 MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA	 Laboratorio de Salud Pública	Técnica de Coloraciones	Código: PRO.DB-LSP.MI.117
			Vigencia: 2/2/16
			Revisión: 9/3/20
			Versión: 01

OBJETIVO del presente instructivo es de normatizar, instruir, estandarizar, y establecer la forma de realizar las coloraciones en la DM-LSP.

ALCANCE: personal del Servicio de Micología del Laboratorio de Salud Pública de Tucumán.

REGISTROS

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

RESPONSABILIDADES: personal del Servicio de Micología del Laboratorio de Salud Pública de Tucumán.



Pasantes/Concurrentes/Residentes/Becarios.

DESARROLLO

TIPO DE COLORACIONES

1. Coloración de Giemsa
2. Azul de o-toluidina
3. Gram
4. Zielh Nielsen
5. Azul de metileno
6. Kinyoun modificado
7. Grocott
8. Azul de Comassie

Elaboración	Revisión	Aprobación
Natalia Márquez	Christian Alvarez	Gabriela Alcaraz
Técnica de División Micología	Jefe de División Micología - LSP	Dirección

 MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA	 <small>Departamento de Microbiología Laboratorio de Salud Pública</small>	<h2>Técnica de Coloraciones</h2>	Código: PRO.DB-LSP.MI.I17
			Vigencia: 2/2/16
			Revisión: 9/3/20
			Versión: 01

1-COLORACION DE GIEMSA

Técnica:



- Fijar los extendidos con metanol por 2 minutos
- Luego lavar con agua corriente y dejar una película de agua sobre el extendido.
- Agregar 5 gotas de Giemsa y dejar actuar durante 20 minutos.
- Lavar con agua corriente y dejar secar.

2-AZUL DE O TOLUIDINA modificado (OT)

Técnica:

- Fijar los extendidos con alcohol etílico absoluto durante 1 minuto,
- Secar 5 minutos.
- Sumergir los vidrios en la Solución A durante 10 minutos, homogeneizar cada 5 minutos para mezclar.
- Lavar suavemente con agua fría durante 5 minutos.
- Cubrir los extendidos con la Solución B durante 12 minutos y luego lavar con metanol 95% por 10 segundos.
- Pasar los extendidos por etanol absoluto otros 10 segundos.
- Aclarar con xilol 10 segundos.
- Secar al aire y examinar con objetivo de inmersión (100x).

Elaboración	Revisión	Aprobación
Natalia Márquez	Christian Alvarez	Gabriela Alcaraz
Técnica de División Micología	Jefe de División Micología - LSP	Dirección

 MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA	 LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA	<h2>Técnica de Coloraciones</h2>	Código: PRO.DB-LSP.MI.I17
			Vigencia: 2/2/16
			Revisión: 9/3/20
			Versión: 01

3-GRAM

Técnica:



- Realizar los extendidos y dejar secar a temperatura ambiente,
- Fijar a la llama, flameándolos 2-4 veces.
- Cubrir con solución de Violeta de Genciana y dejar actuar 1 minuto.
- Lavar con agua.
- Luego, cubrir con solución de Lugol y dejar actuar 1 minuto.
- Lavar con agua.
- Posteriormente, decolorar con solución de Alcohol / Acetona, hasta que las zonas delgadas del preparado estén blancas. Esta lleva aproximadamente 10 segundos y por último,
- Cubrir con solución de Safranina y dejar actuar 1 min.
- Lavar con agua y dejar escurrir y secar a temperatura ambiente.

4-ZIEHL-NEELSEN

Técnica:

- Secar los preparados a temperatura ambiente y fijar a la llama, flameándolos 2-4 veces.
- Cubrir el preparado con la solución de Fucsina Fenicada. Dejar actuar por 5 min.
- Calentar el portaobjeto hasta desprendimiento de vapores blancos. (Repetir 3 veces).
- Lavar con agua corriente.
- Decolorar con solución de Ácido Sulfúrico hasta que la solución decolorante no arrastre más colorante.
- Lavar con agua corriente.
- Cubrir el preparado con solución de Azul de Metileno, y dejar actuar 1 min.
- Lavar con agua corriente.
- Escurrir y secar a temperatura ambiente.

Elaboración	Revisión	Aprobación
Natalia Márquez	Christian Alvarez	Gabriela Alcaraz
Técnica de División Micología	Jefe de División Micología - LSP	Dirección

 MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA	 <small>Departamento de Microbiología Laboratorio de Salud Pública</small>	<h2>Técnica de Coloraciones</h2>	Código: PRO.DB-LSP.MI.I17
			Vigencia: 2/2/16
			Revisión: 9/3/20
			Versión: 01

5-AZUL DE METILENO

Técnica



- Preparar el extendido con el producto del raspado de la lesión y suero para pegar las escamas.
- Dejar secar al aire.
- Fijar con metanol 1 minuto
- Inundar el preparado lentamente (para no despegar el material) con el colorante Azul de Metileno,
- Dejar durante 1 minuto.
- Lavar el extendido suavemente por inmersión en agua, dejar secar al aire.

6- KINYOUN MODIFICADO

Técnica

- Preparar el extendido y fijarlo a la llama
- Cubrir el portaobjeto con papel de filtro
- Inundar el portaobjetos con fuccina fenicada durante 5 minutos
- Volcar el exceso de colorante y lavar con agua inmediatamente
- Decolorar con la solución B (H₂SO₄ al 1%) y lavar con agua
- Colocar el contracolorante (azul de metileno) por 1 minuto
- Lavar con agua y dejar secar
- Observar en campo de inmersión (1000X).

Elaboración	Revisión	Aprobación
Natalia Márquez	Christian Alvarez	Gabriela Alcaraz
Técnica de División Micología	Jefe de División Micología - LSP	Dirección

 MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA	 <small>Departamento de Bacteriología Laboratorio de Salud Pública</small>	<h2>Técnica de Coloraciones</h2>	Código: PRO.DB-LSP.MI.I17
			Vigencia: 2/2/16
			Revisión: 9/3/20
			Versión: 01

7-GROCOTT

Técnica

Fijación:

- Fijar a la llama 3 veces
- Película de Metanol hasta secado a T° ambiente
- No lavar

Mordiente:

- Película de Ácido Crómico al 10% sobre varilla 10 minutos
- Lavar con Agua corriente una vez
- Descartar el agua
- Película de Bisulfito al 1% 1 minuto, para eliminar el exceso de Ácido Crómico.
- Lavar con Agua destilada 5 veces
- Pasar a jarra de Coplin y agregar la mezcla de solución I y II



Preparar en el momento:

SOLUCIONES	2-5 frotis (1 jarra Coplin)	6-10 frotis (2 jarras Coplin)
Solución I	25 ml Agua destilada + 3 ml de Bórax	50 ml Agua destilada + 6 ml de Bórax
Solución II	25 ml Metenamina 3% + 625 ul de Nitrato de Plata	50 ml Metenamina 3% + 1,25 ml de Nitrato de Plata

Coloración:

- Calentar en microondas al 50% de potencia, durante 1 min 20seg, ver viraje de color. Si no cambia repetir el procedimiento disminuyendo el tiempo de calentamiento, hasta ver cambio de color en la mezcla.
- Sacar de la jarra y colocar los portas sobre varilla
- Lavar con agua corriente (tibia) 5 veces
- Lavar con agua destilada y dejar una película de ésta durante 5 minutos
- Descartar el agua destilada
- Agregar una película de tiosulfato 5 minutos para reducir el exceso de Nitrato de Plata
- Lavar con Agua destilada 5 veces
- Dejar una película de agua destilada 5 minutos
- Agregar 3 gotas de Verde Luz, soplar y dejar colorear 10 min

Elaboración	Revisión	Aprobación
Natalia Márquez	Christian Alvarez	Gabriela Alcaraz
Técnica de División Micología	Jefe de División Micología - LSP	Dirección

 MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA	 Departamento Microbiológico Laboratorio de Salud Pública	Técnica de Coloraciones	Código: PRO.DB-LSP.MI.I17
			Vigencia: 2/2/16
			Revisión: 9/3/20
			Versión: 02

8 Azul de Comassie

- Humedecer el papel de filtro en agua destilada y retirarlo cuidadosamente.
- Colocar 3 MI con pipeta Pasteur, solución colorante (Azul de Comassie) durante 1 minuto.
- Lavar con agua destilada.
- Colocar solución decolorante (solución con ácido acético) durante 5 minutos, hasta buena resolución (las bandas deben aparecer azul). descartar y repetir decoloración dos veces más.
- Lavar con agua destilada. Descartar
- Secar en estufa de esterilización a 60° durante 2 hs.

Nota: coloración de grocott

- Calentar en microondas a 50% de potencia, durante 1 minuto y luego repetir 3 veces 20 segundos, hasta ver cambio de color en la mezcla.

Elaboración	Revisión	Aprobación
Natalia Márquez	Christian Alvarez	Gabriela Alcaraz
Técnica de División Micología	Jefe División Micología	Dirección