

 MINISTERIO DE <b>SALUD PÚBLICA</b>	 Departamento Bioquímico Laboratorio de Salud Pública	<h2>Técnica de Coloraciones</h2>	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
<b>Natalia Márquez</b>	<b>Christian Alvarez</b>	<b>Gabriela Alcaraz</b>
Técnica de División Micología	Jefe de División Micología - LSP	Dirección

 <b>MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA</b>	 <b>LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA</b>	<b>Técnica de Coloraciones</b>	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).

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

 <b>MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA</b>	 <b>DB LSP</b> <small>Departamento 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

### 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
<b>Natalia Márquez</b>	<b>Christian Alvarez</b>	<b>Gabriela Alcaraz</b>
Técnica de División Micología	Jefe de División Micología - LSP	Dirección

 <b>MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA</b>	 <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 ( H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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).

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

 <b>MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA</b>	 <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

## 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
<b>Natalia Márquez</b>	<b>Christian Alvarez</b>	<b>Gabriela Alcaraz</b>
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
<b>Natalia Márquez</b>	<b>Christian Alvarez</b>	<b>Gabriela Alcaraz</b>
Técnica de División Micología	Jefe División Micología	Dirección