



ESE HOSPITAL SAN RAFAEL NIVEL II
SAN JUAN DEL CESAR / LA GUAJIRA

Siempre contigo

MANUAL DE COLORACIONES



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 2 de 22

Tabla de contenido

1. INTRODUCCION	3
2. OBJETIVO (S).....	5
2.1. OBJETIVO GENERAL	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3. ALCANCE	5
4. RESPONSABLE	5
6. REQUISITOS LEGALES.....	7
7. DESCRIPCION	8
7.1. Descripción de las actividades operativas.....	8
7.1.1. Preparación de un frotis:.....	8
7.2. Coloraciones.	8
7.2.1. Coloración de wright:	8
7.2.2. Coloración de gram:	11
7.2.3. Coloración de Ziehl Neelsen:.....	15
7.2.4. Coloración de Field Gota Gruesa	18
7.2.5. Coloracion de Giemsa	20
7.3. RECOMENDACIONES IMPORTANTES	20
8. GESTION DEL RIESGO	20
9. DIFUSION:	21
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	21
11. ANEXOS	21
12. CONTROL DE CAMBIO:.....	22
13. CONTROL DEL DOCUMENTO:.....	22



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 3 de 22

1. INTRODUCCION

La mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares. Muchos colorantes utilizados con frecuencia son moléculas cargadas positivamente (cationes) y se combinan con intensidad con los constituyentes celulares cargados negativamente, tales como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos. Ejemplos de colorantes catiónicos son el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina. Otros colorantes son moléculas cargadas negativamente (aniones) y se combinan con los constituyentes celulares cargados positivamente, tales como muchas proteínas. Esos colorantes incluyen la eosina, la fucsina ácida y el rojo Congo. Otro grupo de colorantes son sustancias liposolubles; los colorantes de este grupo se combinan con los materiales lipídicos de la célula, usándose a menudo para revelar la localización de las gotículas o depósitos de grasa. Un ejemplo de colorante liposoluble es el negro Sudán.

El tamaño de la mayoría de las células bacterianas es tal que resultan difíciles de ver con el microscopio óptico. La principal dificultad es la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea, y el medio más simple de aumentar el contraste es la utilización de colorantes. Estos pueden emplearse para distinguir entre tipos diferentes de células o para revelar la presencia de determinados constituyentes celulares, tales como flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, centros de actividad respiratoria, etc.

Las células generalmente son tratadas para coagular el protoplasma antes de teñirlas, proceso llamado fijación. Para bacterias, la fijación por el calor es lo más corriente, aunque también puede fijarse con sustancias químicas como formaldehído, ácidos y alcoholes. Después de la fijación, si se añade el colorante, no se producen ulteriores cambios estructurales en el protoplasma.

La fijación se realiza habitualmente en células que han sido fijadas sobre un portaobjetos, tratando después éste con el agente fijador, y siguiendo inmediatamente el proceso de tinción. La fijación produce habitualmente el



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 4 de 22

encogimiento de las células; la tinción, por el contrario, hace que las células aparezcan mayores que lo que son realmente, de manera que las medidas de las células que han sido fijadas o teñidas no pueden realizarse con mucha precisión.

Algunos colorantes teñirán mejor sólo después de que la célula haya sido tratada con otra sustancia química, que no es un colorante por sí mismo. Esta sustancia se denomina mordiente; un mordiente habitual es el ácido tánico. El mordiente se combina con un constituyente celular y lo altera de tal modo que ahora sí podrá atacar el colorante.

Si se desea simplemente incrementar el contraste de las células para la microscopía, son suficientes los procedimientos simples de tinción. El azul de metileno es un buen colorante simple que actúa sobre todas las células bacterianas rápidamente y que no produce un color tan intenso que oscurezca los detalles celulares. Es especialmente útil para detectar la presencia de bacterias en muestras naturales, puesto que la mayor parte del material no celular no se tiñe.

La tinción negativa es el reverso del procedimiento de tinción usual: las células se dejan sin teñir, pero se colorea en cambio el medio que las rodea. Lo que se ve, por tanto, es el perfil de las células. La sustancia utilizada para la tinción negativa es un material opaco que no tiene afinidad por los constituyentes celulares y que simplemente rodea las células, tal como la tinta china (que es una suspensión de partículas de carbono coloidal) o la nigrosina (un colorante negro insoluble en agua).

La tinción negativa es un modo satisfactorio de aumentar el contraste de las células en la microscopía óptica, pero su máxima utilidad está en revelar la presencia de cápsulas alrededor de las células bacterianas.



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 5 de 22

Los métodos de tinción son de gran utilidad, pero deben usarse siempre con precaución, ya que pueden conducir a errores. Las moléculas de colorante forman en ocasiones precipitados o agregados que parecen estructuras celulares auténticas, pero que son formaciones completamente artificiales inducidas por el mismo colorante. Tales estructuras se denominan artefactos, y deben tomarse muchas precauciones para tener la seguridad de que no nos estamos equivocando al creer que un artefacto es una estructura realmente existente.

2. OBJETIVO (S)

2.1. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar las técnicas utilizadas para el procedimiento en las coloraciones que se realizan en el Laboratorio Clínico de la E.S.E Hospital San Rafael Nivel II.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Socializar la información necesaria para la coloración de láminas, con todo el personal del laboratorio clínico de ESE Hospital San Rafael Nivel II.
- ❖ Descripción y actualización de procedimientos técnicos de las diferentes coloraciones que se realizan en de la E.S.E Hospital San Rafael Nivel II.

3. ALCANCE

El presente documento va dirigido al personal de bacteriología y auxiliar de laboratorio, que pertenezca al laboratorio clínico de la ESE San Rafael Nivel II.

4. RESPONSABLE

Bacteriólogas y auxiliares de laboratorio

5. TERMINOS Y DEFINICIONES

Ácidos nucleicos: Los ácidos nucleicos almacenan la información genética de los organismos vivos y son los responsables de la transmisión hereditaria. Existen dos tipos básicos, el ADN y el ARN.



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 6 de 22

Célula: Es la unidad morfológica y funcional de todo ser vivo, es el elemento de menor tamaño que puede considerarse vivo. De este modo, puede clasificarse a los organismos vivos según el número de células que posean: si solo tienen una, se les denomina unicelulares (como pueden ser los protozoos o las bacterias, organismos microscópicos); si poseen más, se les llama pluricelulares.

Colorantes: Un colorante es una sustancia que es capaz de teñir las fibras vegetales y animales. Los colorantes se han usado desde los tiempos más remotos, empleándose para ello diversas materias procedentes de vegetales (cúrcuma, índigo natural, etc.) y de animales (cochinilla, moluscos, etc.) así como distintos minerales.

Histología: Es la disciplina que estudia todo lo relacionado con los tejidos orgánicos: su estructura microscópica, su desarrollo y sus funciones. La histología se identifica a veces con lo que se ha llamado anatomía microscópica, pues su estudio no se detiene en los tejidos, sino que va más allá, observando también las células interiormente y otros corpúsculos, relacionándose con la bioquímica y la citología.

Microscopio: Instrumento óptico para ampliar la imagen de objetos o seres, o de detalles de estos, tan pequeños que no se pueden ver a simple vista; consta de un sistema de lentes de gran aumento.

Microscopia: Es el conjunto de técnicas y métodos destinados a hacer visible los objetos de estudio que por su pequeñez están fuera del rango de resolución del ojo normal. Si bien el microscopio es el elemento central de la microscopía, el uso del mismo se requiere para producir las imágenes adecuadas, de todo un conjunto de métodos y técnicas afines pero extrínsecas al aparato. Algunas de ellas son,



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 7 de 22

técnicas de preparación y manejo de los objetos de estudio, técnicas de salida, procesamiento, interpretación y registro de imágenes.

Tinción o coloración: Es una técnica auxiliar utilizada en microscopía para mejorar el contraste en la imagen vista al microscopio. Los colorantes y tinturas son sustancias que usualmente se utilizan en biología y medicina para resaltar estructuras en tejidos biológicos que van a ser observados con la ayuda de diferentes tipos de microscopios.

6. REQUISITOS LEGALES

- ❖ Decreto 1011 de 2006. “Por el cual se establece el Sistema Obligatorio de Garantía de Calidad de la Atención de Salud del Sistema General de Seguridad Social en Salud”.
- ❖ Resolución 412 del Ministerio de Salud. “Por la cual se establecen las actividades, procedimientos e intervenciones de demanda inducida y obligatorio cumplimiento y se adoptan las normas técnicas y guías de atención para el desarrollo de las acciones de protección específica y detección temprana y la atención de enfermedades de interés en salud pública”.
- ❖ Resolución 3384 de 2000 del Ministerio de Salud. “Por la cual se Modifican Parcialmente las Resoluciones 412 y 1745 de 2000 y se Deroga la Resolución 1078 de 2000”.
- ❖ Resolución 4505 de 2012 del Ministerio de Salud y Protección Social. “Por la cual se establece el reporte relacionado con el registro de las actividades de Protección Específica, Detección Temprana y la aplicación de las Guías de Atención Integral para las enfermedades de interés”.
- ❖ Anexo Técnico No.1 de la Resolución 1445 de 2006 del Ministerio de la Protección Social. “Por la cual se definen las funciones de la Entidad Acreditadora y se adoptan otras disposiciones.



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 8 de 22

7. DESCRIPCION

7.1. Descripción de las actividades operativas

7.1.1. Preparación de un frotis:

Sobre un portaobjetos de vidrio, limpio y seco, se coloca una gota del material que se va a teñir (si es líquido) o se hace rodar el hisopo con que se tomó la muestra. Una vez que el hisopo ha tocado la superficie del portaobjetos, que no está estéril, ya no puede ser empleado para inocular los medios de cultivo.

Puede usarse una aguja estéril para transferir una pequeña cantidad de un cultivo bacteriano a la superficie del portaobjetos. Este material es suspendido en una gota de agua o solución salina previamente colocada sobre el portaobjetos. Cuando se trata de colonias muy pequeñas que pueden perderse en una gota de líquido se emplea una varilla delgada de madera estéril con la cual se toca la colonia obteniéndose así una fracción apreciable del desarrollo.

El material se frota directamente sobre el portaobjetos, donde puede visualizarse con facilidad. El material colocado en el portaobjetos se deja secar al aire o bien se pasa varias veces por la zona azul de la llama de un mechero de Bunsen hasta que el vidrio esté tan caliente que moleste al tacto, pero no queme.

Según la manipulación que efectuemos sobre la muestra a observar y según los colorantes que empleemos durante el proceso, podemos hablar de diferentes modalidades de tinción.

7.2. Coloraciones.

7.2.1. Coloración de wright:

La tinción de Wright es un tipo de tinción usada en histología para facilitar la diferenciación de los tipos de células de la sangre. Se usa principalmente para teñir frotis de sangre y punciones medulares, para ser examinadas al microscopio.



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 9 de 22

Lleva el nombre James Homer Wright su inventor, que la obtuvo modificando la tinción de Romanowsky, en 1902.

Debido a que ayuda a distinguir fácilmente las células de la sangre se convirtió en una técnica muy usada para el conteo de los glóbulos blancos, una técnica rutinaria usada cuando hay sospecha de infecciones.

7.2.1.1. La tinción de Wright es una tinción de tipo Romanowsky.

Una tinción de Romanowsky consiste en azul de metileno y sus productos de oxidación, así como eosina.

La acción combinada de estos colorantes produce el efecto Romanowsky que da una coloración púrpura a los núcleos de los leucocitos y a los gránulos neutrofílicos y da color rosado a los eritrocitos. Los componentes de este efecto son el azul B y la eosina Y.



Ilustración 1 COLORACION DE WRIGTH

Las propiedades de tinción de Romanowsky dependen del enlace de los colorantes a las estructuras químicas y de las interacciones del azul B y la eosina Y. Los agrupamientos de ácidos nucleicos, las proteínas de los núcleos celulares y el citoplasma inmaduro reactivo, fijan el azul B, colorante básico. La tinción de Wright cuyo colorante está compuesto de azul de metileno (que tiñe de color azul las partes ácidas de las células) y eosina (que tiñe las partes alcalinas) disueltos en metanol (que permite la fijación de las células), adicionando a la preparación buffer de fosfatos (que re hidrata a las células después de la exposición con metanol).



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 10 de 22

Este colorante tiñe con azul de Metileno las estructuras ácidas del núcleo, la eosina tiñe las sustancias básicas del citoplasma especialmente la hemoglobina.

Las preparaciones óptimas permiten diferenciar gránulos, vacuolas, cromatina, etc., y en consecuencia son muy útiles en el reconocimiento de células hematopoyéticas y sus variaciones patológicas.

7.2.1.2. Procedimiento:

- ❖ Colocar el frotis secado al aire sobre una rejilla o cubeta de tinción con la sangre hacia arriba y con la identificación dirigida hacia el operador.
- ❖ Cubrir completamente el portaobjetos con el colorante de Wright.
- ❖ Dejarlo que permanezca en el frotis durante 3 minutos, para fijar los glóbulos sanguíneos. El colorante deberá cubrir completamente el portaobjetos, pero no debe derramarse por los bordes.
- ❖ Agregar directamente al colorante un volumen igual de amortiguador (buffer) de Wright, para evitar la coloración débil. Esperar la formación de brillo metálico. Puede usarse de igual manera agua des ionizada. Dejar actuar 3 minutos.
- ❖ Lavar con abundante agua cuidadosamente hasta que la extensión presente un aspecto rosado al examinarlo a simple vista.
- ❖ Limpiar el dorso del portaobjetos.
- ❖ Dejar secar al aire en posición vertical.
- ❖ Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

La coloración de Wright es responsabilidad del auxiliar de laboratorio clínico en la ESE Hospital San Rafael Nivel II. quien realizará la tinción de acuerdo a este manual, y quien tendrá supervisión del bacteriólogo a cargo de la sección de microscopia; así mismo en el caso de no estar disponible el auxiliar de laboratorio el profesional a cargo tendrá la responsabilidad de realizar los procedimientos de tinción de Wright.



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 11 de 22

7.2.2. Coloración de gram:

La coloración de Gram es la más importante en Bacteriología, permite en la mayoría de los casos establecer un diagnóstico presuntivo teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- ❖ Morfología celular
- ❖ Característica tintorial
- ❖ Agrupación celular

Es un tipo de tinción diferencial empleado en bacteriología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram (1853-1938), que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias gram positivas a las que se visualizan de color morado, y bacterias gram negativas a las que se visualizan de color rosa, rojo o grosella.

El cristal violeta (colorante catiónico) penetra en todas las células bacterianas (tanto gram positivas como gram negativas) a través de la pared bacteriana. El lugol es un compuesto formado por I₂ (yodo) en equilibrio con KI (yoduro de potasio) y SI (Siulterio), los cuales están presentes para solubilizar el yodo, y actúan de mordiente, haciendo que el cristal violeta se fije con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana. El I₂ entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta.

La mezcla de alcohol-acetona que se agrega, sirve para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo I₂/cristal violeta. Los organismos gram positivos no se decoloran, mientras que los gram negativos sí lo hacen.

Para poner de manifiesto las células gram negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la fucsina. Después



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 12 de 22

de la coloración de contraste las células gram negativas son rojas, mientras que las gram positivas permanecen violetas.

La fucsina puede o no utilizarse, no es crucial para la técnica. Sirve para hacer una tinción de contraste que pone de manifiesto las bacterias gram negativas. Al término del protocolo, las gram positivas se verán azul-violáceas y las gram negativas, se verán rosas (si no se hizo la tinción de contraste) o rojas (si se usó, por ejemplo, fucsina).

En este método de tinción, la extensión bacteriana se cubre con solución de uno de los colorantes de violeta de metilo, que se deja actuar durante un lapso determinado. Se escurre luego el exceso de violeta de metilo y se añade luego una solución de yodo, que se deja durante el mismo tiempo que la anterior; después se lava el portaobjetos con alcohol hasta que éste no arrastre más colorante. Sigue a tal tratamiento una coloración de contraste, como fucsina.

Algunos microorganismos retienen el colorante violeta, aún después de tratarlos con un decolorante, y el color no se modifica al añadir éste; otros pierden con facilidad el primer tinte, y toman el segundo. Los que fijan el violeta, se califican de gram positivos, y los que pierden la primera coloración y retienen la segunda, de gram negativos.

La facultad de las células para tomar la coloración gram no es propia de toda sustancia viviente, sino que se limita casi en absoluto a hongos y bacterias. Así vemos que las células de plantas y animales superiores no conservan la primera coloración; los mohos se tiñen con cierta irregularidad; los gránulos de micelios propenden retener el colorante. La reacción de Gram no es infalible ni constante; puede variar con el tiempo del cultivo y el pH del medio, y quizá por otras causas.





NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 13 de 22

Los fundamentos de la técnica se basan en las diferencias entre las paredes celulares de las bacterias gram positivas y gram negativas.

La pared celular de las bacterias gram positivas posee una gruesa capa de peptidoglicano, además de dos clases de ácidos teicoicos: anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática, se encuentra el ácido lipoteicoico, y más en la superficie, el ácido teicoico que está anclado solamente en el peptidoglicano (también conocido como mureína).

Por el contrario, la capa de peptidoglicano de las gram negativas es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior (de composición distinta a la interna) por medio de lipoproteínas. Tiene una capa delgada de peptidoglicano unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido.

Por lo tanto, ambos tipos de bacterias se tiñen diferencialmente debido a estas diferencias constitutivas de su pared. La clave es el peptidoglicano, ya que es el material que confiere su rigidez a la pared celular bacteriana, y las gram positivas lo poseen en mucha mayor proporción que las gram negativas.

La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, se debe a que la membrana externa de las gram negativas es soluble en solventes orgánicos, como por ejemplo la mezcla de alcohol/acetona. La capa de peptidoglicano que posee es demasiado delgada como para poder retener el complejo de cristal violeta/yodo que se formó previamente, y por lo tanto este complejo se escapa, perdiéndose la coloración azul-violácea. Pero, por el contrario, las gram positivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglicanos, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que este actúa deshidratando los poros, cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, y manteniendo la coloración azul-violeta.



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 14 de 22

TINCION DE GRAM

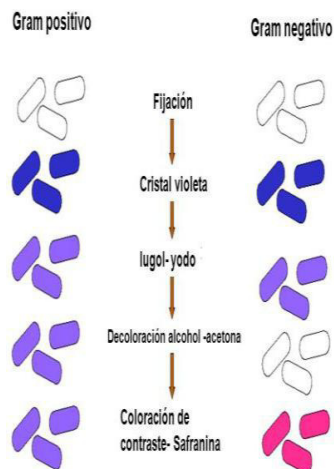


Ilustración 2 Pasos de la coloración de Gram

7.2.2.1. Procedimiento:

Los pasos que se han de seguir para realizar la coloración son los siguientes:

- ❖ Se fija la muestra mediante calor 3 veces.
- ❖ Colocar el frotis fijado sobre una rejilla o cubeta de tinción con la muestra hacia arriba y con la identificación dirigida hacia el operador.
- ❖ Adicionar el Cristal Violeta (tiñe todas las bacterias, gram positivas y gram negativas) durante 1 minuto.
- ❖ Lavar con abundante agua.
- ❖ Se fija con Lugol durante 1 minuto.
- ❖ Lavar con abundante agua.
- ❖ Se decolora con etanol cetona durante 30 segundos.
- ❖ Lavar con abundante agua.
- ❖ Adicionar fucsina como colorante de contraste durante 1 minuto.
- ❖ Lavar con abundante agua.
- ❖ Dejar secar al aire en posición vertical.
- ❖ Observar al microscopio con objetivo de inmersión.



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 15 de 22

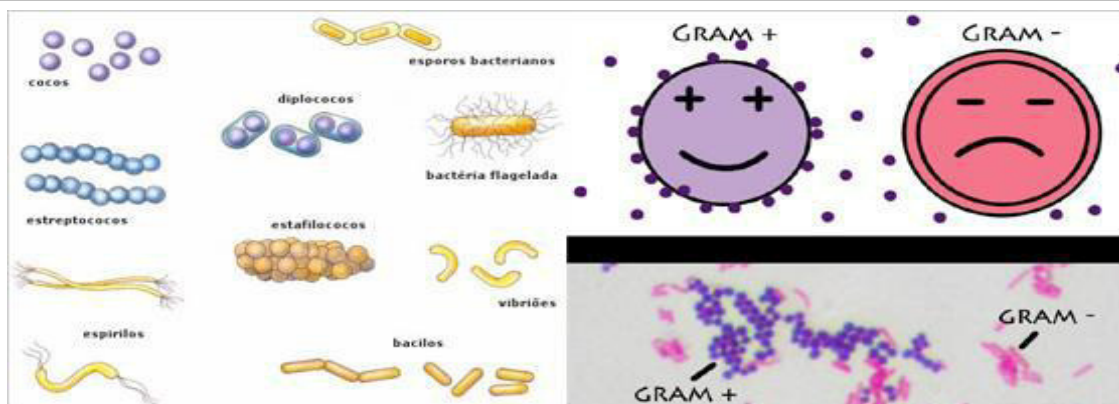


Ilustración 3 Morfologías distinguibles en la tinción de gram

La coloración de Gram es responsabilidad del auxiliar de laboratorio clínico en la ESE Hospital San Rafael Nivel II. quien realizará la tinción de acuerdo a este manual, y quien tendrá supervisión del bacteriólogo a cargo de la sección de microscopia; así mismo en el caso de no estar disponible el auxiliar de laboratorio el profesional a cargo tendrá la responsabilidad de realizar los procedimientos de tinción de Gram.

7.2.3. Coloración de Ziehl Neelsen:

Las bacterias ácido alcohol resistentes pertenecen al género *Mycobacterium* (Bacilo tuberculoso, Bacilo de la lepra).

Esta denominación se debe a la capacidad de resistir la decoloración con un alcohol y un ácido fuerte cuando han sido previamente teñidas, esta propiedad se debe a que estas bacterias poseen en su pared ácidos micólicos.

Fue descrita por primera vez por dos médicos alemanes, Franz Ziehl (1859 a 1926) bacteriólogo y Friedrich Neelsen (1854 a 1894) patólogo.

Las paredes celulares de ciertas bacterias contienen ácidos grasos (ácidos micólicos) de cadena larga (50 a 90 átomos de carbono) que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 16 de 22

colorantes básicos. Por esto se denominan ácido-alcohol resistente. Las micobacterias como *Mycobacterium tuberculosis* y *M. marinum* se caracterizan por sus propiedades de ácido-alcohol resistencia.

La coloración clásica de Ziehl-Neelsen requiere calentamiento para que el colorante atraviese la pared bacteriana que contiene ceras. Al suspender el calentamiento y enfriar con agua, provoca una nueva solidificación de los ácidos grasos de modo que el colorante ya no puede salir de las bacterias. Por otro lado, el calentamiento aumenta la energía cinética de las moléculas del colorante lo cual también facilita su entrada a las bacterias.

Las bacterias que resisten la decoloración son de color rojo y las que no, se ven de color azul ya que se utiliza azul de metileno como tinción de contraste.

7.2.3.1. Procedimiento:

Los pasos que se han de seguir para realizar la coloración son los siguientes:

- ❖ Coloque las láminas sobre el soporte con el extendido hacia arriba, separadas y con la identificación orientada hacia el operador.
- ❖ Fijar el extendido con calor (mechero) tres veces evitando quemar la lámina
- ❖ Cubra la totalidad de la lámina con Fucsina de Ziehl Neelsen.
- ❖ Caliente suavemente con la llama de un mechero, pasándolo por debajo de las láminas hasta que se produzca emisión de vapores, evitando que hierva durante 5 minutos. Cuando los vapores son visibles, dejar de calentar y cuando desaparezcan volver a calentar. Si ocurre evaporación de colorante se debe agregar un poco más de colorante.
- ❖ Dejar enfriar y lavar con abundante agua.
- ❖ Cubrir el extendido con Alcohol ácido durante 3 minutos.
- ❖ Lavar con abundante agua.
- ❖ Cubrir el extendido con Azul de Metileno durante 1 minuto.
- ❖ Lavar con abundante agua.



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 17 de 22

- ❖ Limpiar el dorso del portaobjetos.
- ❖ Dejar secar al aire en posición vertical.
- ❖ Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

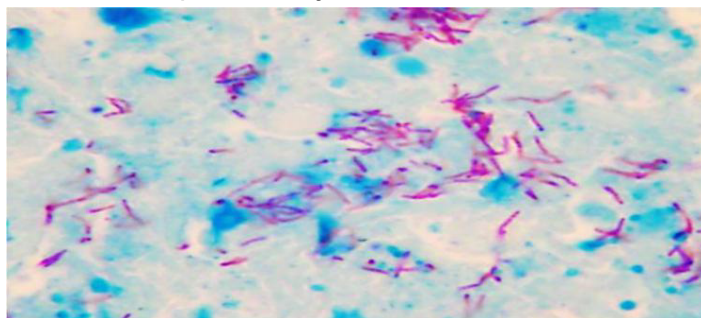


Ilustración 4 Coloración de Ziehl Neelsen

El extendido de la muestra y la **coloración** de Ziehl Neelsen está a cargo de la auxiliar de Laboratorio Clínico en la **ESE Hospital San Rafael Nivel II**, es quien realizara la tinción de acuerdo a este manual.

7.2.3.2. Condiciones especiales para tinción de Neelsen

Además, para esta tinción el profesional responsable debe utilizar los implementos de bioseguridad como los son:

- ❖ Gorro
- ❖ Bata
- ❖ Mono Gafas
- ❖ Tapa bocas N95
- ❖ Guantes



Ilustración 5 Implementos de bioseguridad



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 18 de 22

7.2.4. Coloración de Field Gota Gruesa

Son varios parásitos sanguíneos que se pueden diagnosticar por medio de la gota gruesa y se utiliza la coloración de Giemsa donde se encuentra el *Plasmodium* spp, *Leishmania* spp, *Tripanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* y las Micro filarias. La malaria o paludismo es la enfermedad infecciosa tropical más importante en el mundo, y la enfermedad contagiosa que más muertes causa a excepción de la tuberculosis. En muchos países desarrollados, y en África especialmente, la malaria cobra muchas vidas. La malaria por *P. falciparum* presenta el mayor número de complicaciones, por esto se le denomina terciana maligna o perniciosa, la complicación más peligrosa es el compromiso cerebral. El *P. vivax* y *P. ovale* producen la fiebre terciana benigna y el *P. malarie* la fiebre cuaternaria. La leishmaniosis es una enfermedad producida por un protozoo flagelado, llamado *Leishmania* spp que se transmite por la picadura de un insecto vector pertenecientes al género *Phlebotomus* y *Lutzomia* y que puede dar una patología cutánea, mucocutánea o visceral en perros, personas y otros mamíferos. La sintomatología clínica puede ser muy variada dependiendo del grado de infección, el estado inmunitario del hospedador, el tiempo de evolución y los órganos afectados. La enfermedad del Chagas es producida por un parásito unicelular microscópico el *Tripanosoma cruzi*. Se localiza en la sangre y en los tejidos de las personas y animales enfermos. Se multiplica en el interior de las células de algunos órganos, por ejemplo, el corazón, a los que daña seriamente. El *Toxoplasma gondii* es un protozoo intracelular perteneciente a la familia de las coccidias, produce la enfermedad llamada toxoplasmosis. Los hospederos definitivos son los gatos y otros felinos, el parásito se localiza en el ámbito intestinal. Las micro filarias son otros parásitos que circulan en la sangre periférica o en la linfa, de donde son ingeridas por artrópodos hematófagos los cuales sirven de vectores, considerados los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*.

A continuación, imágenes de algunos hemoparásitos:



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

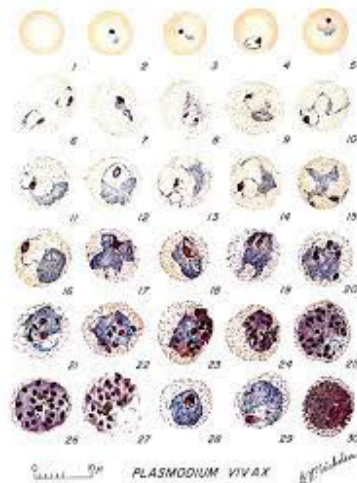
Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 19 de 22



7.2.4.1. Procedimiento

- ❖ Gota gruesa Se hace un frotis para gota gruesa con sangre capilar, se deja secar, se colorea con azul de metileno deshemoglobinizar durante 30 segundos.
- ❖ Se deja secar inclinada sin lavar.
- ❖ Luego se hace una dilución en 3cc de sales fosfatadas una gota de colorante “A” y una gota de colorante “B” ey se colorea por inversión sobre esta dilución durante 9 minutos.
- ❖ Se deja secar y se mira en el microscopio en 100X para buscar hemoparásitos.
- ❖ Parasitemia: Es el numero de parásitos por micro litro de sangre. Su utilidad es conocer el número de trofozoítos y esquistosomas contados conjuntamente y los gametocitos separadamente.

Formula:

$$\text{PARASITEMIA} = \frac{\text{Número de parásitos} \times \text{leucocitos del paciente (8.000)}}{\text{Número de leucocitos contados (100).}$$



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 20 de 22

- ❖ Para los casos de malaria por *Pl. vivax* no se debe hacer recuento ni diferenciación, en el paludismo por *Pl. falciparum* se debe informar por separado formas asexuadas de las sexuadas.
- ❖ En infecciones mixtas se informa primero el parásito predominante y luego el de menor cantidad

7.2.5. Coloracion de Giemsa

7.2.5.1. Procedimientos

- ❖ realizar extendido y dejar secar
- ❖ Fijar con Metanol cubriendo la lámina y retirándolo de inmediato
- ❖ Escurrir (ojo no se lava) y dejar secar
- ❖ En 3 ml de agua destilada adicionar 1 ml de Giemsa, mezclar y agregar esta solución a las láminas
- ❖ Lavar con agua de grifo limpiando perfectamente la superficie posterior del froto para evitar alteraciones en la observación y dejar secar

7.3. RECOMENDACIONES IMPORTANTES

- ❖ Si las láminas quedan con precipitado, realizar nuevas muestras, volver a filtrar y realizar las respectivas coloraciones
- ❖ Filtrar regularmente los colorantes para evitar precipitados.
- ❖ No exceder el tiempo en las coloraciones.
- ❖ Marcar bien las muestras para evitar que estas se borren en el momento de aplicar el alcohol y de igual manera que se confundan
- ❖ Tener en cuenta las indicaciones en el momento de la recolección y toma de la misma para evitar la solicitud de nuevas muestras.

8. GESTION DEL RIESGO

Riesgo	Acción preventiva
Caída de la red eléctrica en la ESE	La red de soporte o planta eléctrica de la ESE debe funcionar inmediatamente.
Ausencia o demora de transporte de	Las muestras tomadas refrigeradas o puestas



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 21 de 22

muestras provenientes de puestos de salud asociados a la ESE	en año serológico para conservar temperatura de 37°C para su posterior envío según la naturaleza de la muestra
Confusión en la entrega de muestras	Registro diario de pacientes a la mano
Error en la rotulación de la muestra	Supervisión de la toma de muestra y recepción de pacientes por parte de la bacterióloga.

9. DIFUSION:

Una vez aprobado el manual por la Gerencia, revisados por Subdirección científica Asesor de Calidad y Líder de proceso Apoyo diagnóstico y Complementación terapéutica será el responsable cumplimiento de cada una de las actividades descritas, además se realizará el despliegue y la comprensión de la información a los responsables de las actividades dejando evidencia de la reunión de difusión respectiva. La oficina de Gestión de la Calidad tendrá bajo su custodia y control documental los documentos originales impresos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ❖ <https://pipetealo.wordpress.com/2016/12/06/tincion-de-gram/>
- ❖ <http://karyynieto.blogspot.com/2016/09/medidas-de-bioseguridad.html>
- ❖ <https://fiestadelosmicroorganismos.wordpress.com/2016/12/5/practica-10-tincion-de-ziehl-neelsen/>
- ❖ <http://biologiamedica.blogspot.com/2010/09/bacterias-gram-positivas-y-gram.html>

11. ANEXOS

No aplica



NIT: 892115010-5
COD: 4465000286

MANUAL DE COLORACIONES

Código: DT-LC-MA-05

Versión: 3.0

Vigencia: 01/08/2023

APOYO DIAGNOSTICO Y COMPLEMENTACION TERAPEUTICA SUBPROCESO DE LABORATORIO CLINICO

Página 22 de 22

12. CONTROL DE CAMBIO:

Versión	Descripción De Los Cambios	Fecha
1.0	Se crea el documento	-
2.0	Se actualiza Guía de coloraciones	06/02/2017
3.0	Se actualiza según acuerdo 07 de 2021 donde se modifica plataforma documental.	01/08/2023

13. CONTROL DEL DOCUMENTO:

Carmen Mendoza Líder Apoyo Diagnostico y complementación Terapéutica	Henry Fragozo Rodríguez Subdirector científico	María Isabel Cristina Gonzalez Suarez Gerente	01/08/2023	
Elaboró/Actualizó	Revisó	Aprobó	Fecha Ultima aprobación	Medio de aprobación