


| | | |
|--|----------------------------------|---|
|  | <p>INSTRUCTIVO PARAMETRIZADO</p> | <p>VERSION: 6</p> <p>CODIGO: IT-MI-28</p> |
| <p>Coloraciones para la realización de exámenes directos</p> | | <p>FECHA: 01/Abr/2025</p> |

1. Objeto

Proporcionar el procedimiento para la preparación de los colorantes que se usan en Microbiología.

2. Alcance

Aplica para todos los bacteriólogos.

3. Coloración de Gram modificado

Uso

Se usa para observar bacterias compatibles con Campylobacter, son bacilos Gram negativos, cortos en forma de S, en espiral o coma, y causante de infecciones intestinales

Procedimiento

- 1. Fijar la preparación, pasando la lámina 2 o 3 veces por el mechero.
- 2. Cubrir la lámina con el cristal violeta . Lavar inmediatamente con abundante agua, eliminar el exceso de agua.
- 3. Cubrir la lámina con lugol. Lavar inmediatamente con abundante agua. Eliminar el exceso de agua.
- 4. Decolorar con alcohol acetona. Lavar inmediatamente y eliminar el exceso de agua.
- 5. Cubrir la lámina con Fucsina al 0.3% por un minuto. Lavar y eliminar el exceso de agua.
- 6. Dejar secar al aire.

Lectura

Leer con objetivo de 100X. el Campylobacter se observa como un bacilo corto, gram negativo, curvo, en forma de ese, ce, espiral o coma. Algunas veces en forma cocoide, pequeño, gram negativo.

4. Coloración de Ziehl-Neelsen (Para Mycobacterias)

Uso

La tinción de Ziehl-Neelsen es usada para la identificación de bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR).

Fundamento

La ácido-alcohol resistencia es la propiedad que tienen las micobacterias de captar en su pared ciertos colorantes (fucsina fenicada) cuando se utiliza el calor como mordiente, y es capaz de retenerlos después de someterlos a la acción de decolorantes, como la mezcla de ácido y alcohol. Esta característica se debe al alto contenido de ácidos grasos de cadena larga, particularmente ácidos micólicos, que poseen en la pared celular. Los bacilos "ácido-alcohol resistentes" (BAAR), es decir, los que resisten la decoloración, se observan de color rojo, mientras que las otras bacterias se ven de color azul ya que se utiliza azul de metileno como colorante de contraste. Las micobacterias son bacilos ácido-alcohol resistentes, cortos, y ligeramente curvos.

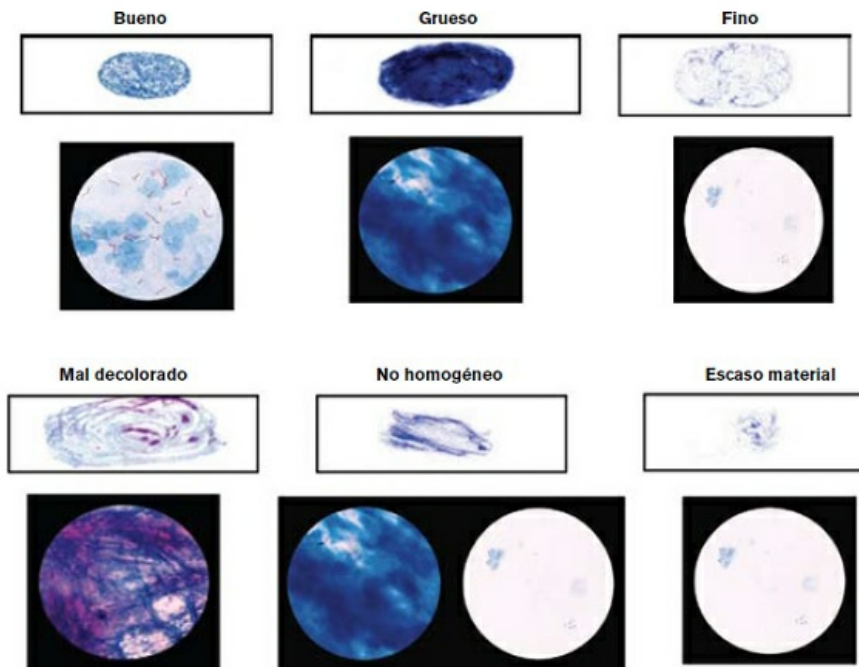
Procedimiento:

- a. Partir un aplicador en dos, tratando de que las puntas queden ásperas, y seleccionar la partícula más purulenta.

Nota: La selección de la partícula más purulenta de la muestra es uno de los pasos más importantes para aumentar la probabilidad de identificar los casos de tuberculosis mediante la bacilos copia directa de esputo.

- b. Extender la partícula útil sobre el portaobjetos en forma homogénea en el centro de la lámina, dibujando un pequeño óvalo de 2 cm de largo por 2 cm de ancho, sin llegar a los bordes de la lámina para evitar que el operador se contamine al manipularla.

- c. Verificar que el extendido tenga grosor homogéneo y adecuado. Si es demasiado fino, es posible producir un resultado falso negativo. Si es muy grueso, el material puede desprenderse durante la coloración o puede resultar difícil la visualización de bacilos debajo de una capa gruesa de mucus.



d. Fijar la preparación pasando la lámina 2 ó 3 veces por el mechero.

e. Cubrir toda la lámina con fucsina.

f. Usando un mechero, calentar la lámina por debajo lentamente hasta que se emita vapores, no dejar hervir. Repetir este proceso durante tres (3) veces, en un periodo de cinco (5) minutos.

g. Lave la lámina con abundante agua.

h. Cubrir la lámina con alcohol ácido y decolorar la preparación durante 3 minutos.

i. Lavar con abundante agua. Eliminar el exceso de agua.

j. Cubrir la lámina con azul de metileno durante un (1) minuto.

k. Lavar la lámina con abundante agua. Eliminar el exceso de agua.

l. Dejar secar al aire.

Las coloraciones de la sede tesoro se enviarán a la sede centro para su respectivo procesamiento.

Lectura

Leer con objetivo de inmersión, las BAAR se tiñen rojos y el fondo se ve azul.

Se deben leer 100 campos y reportar, según la siguiente escala de lectura:

| Resultado del examen microscópico | Informe |
|--|--|
| No se encuentran BAAR en los 100 campos observados | No se observan bacilos ácido-alcohol resistentes |
| Se observan de 1 a 9 BAAR en 100 campos observados | Nº exacto de bacilos en 100 campos |
| Se observa entre 10 y 99 BAAR en 100 campos observados | Positivo (+) |
| Se observan de 1 a 10 BAAR por campo en 50 campos observados | Positivo (++) |
| Se observan más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados | Positivo (+++) |

Existe una modificación en la coloración para evitar vapores que pueden contaminar al personal:

Coloración por el método de Kinyoun (KY)

El procedimiento es el siguiente:

- a. Realizar el extendido en portaobjeto nuevo, limpio y con círculo grabado previamente con punta de diamante.
- b. Fijar las muestras agregando 1 gota de metanol, esperar que se evapore para iniciar proceso (más o menos 5 minutos).
- c. Ubicar las placas en el puente de coloración, asegurándose que este bien nivelado.
- d. Poner encima del extendido una porción de papel filtro que lo cubra totalmente.
- e. Adicionarle Fucsina fenicada sobre el papel filtro, asegurando que quede bien empapado y dejar actuar durante 8 minutos.
- f. Retirar el papel de filtro y enjuagar suavemente con agua corriente
- g. Decolorar con alcohol ácido al 3% durante 2 minutos.
- h. Lavar con abundante agua corriente.
- i. Contrastar con azul de metileno, por 4 minutos.
- j. Lavar con agua.
- k. Dejar secar.
- l. Observar en microscopio de luz.

NOTA: si al observar al microscopio, el contraste del extendido se encuentra de color rojo o rosa, vuelva a decolorar y lave nuevamente, esto puede ocurrir cuando los extendidos son muy gruesos.

5. Coloración de Ziehl Neelsen modificada en frio (Kinyoun)

Es usada para la identificación de bacilos parcialmente ácido-alcohol resistentes (*Nocardia* y algunos *Actinomyces*), y para la identificación de algunos parásitos coccídeos.

Cryptosporidium e *Isospora* han sido reconocidos como causantes de diarrea severa en pacientes inmunocomprometidos. La coloración de Ziehl Neelsen modificado es usada para la visualización de los ooquistes de estas especies, la cual no requiere calentar los reactivos utilizados para la tinción.

Procedimiento (cambiar el procedimiento por este, porque ya no usamos ácido sulfúrico)

1. Fijar la placa pasando la lámina 2 o 3 veces por el mechero.
2. Cubrir con fuchina al 0.3% por cinco minutos, sin calentar.
3. Lavar con abundante agua.
4. Decolorar con alcohol ácido.
5. Lavar con abundante agua.
6. Cubrir la placa con azul de metileno por dos minutos.
7. Lavar con abundante agua.

Lectura

Cryptosporidium e *Isospora*: Leer en objetivo de 100X, y observar las formas del ooquiste de color rojo en un fondo azul.

Nocardia: Leer en objetivo de 100X, y observar bacilos parcialmente ácido-alcohol resistentes.

6. Coloración Azul de metileno de Loeffler

Uso

Para diferenciar leucocitos en materia fecal.

Procedimiento

1. Fijar la preparación al calor.
2. Cubrir la preparación con el colorante. Dejar el colorante durante un minuto.
3. Lavar con agua. Eliminar el exceso de agua y dejar secar.
4. También puede hacerse en fresco: Una gota de azul de metileno en una placa, adicionar un poco de materia fecal, colocar una laminilla. Mirar al microscopio.

Lectura

Leer al microscopio con objetivo de inmersión o 40 X y hacer diferencial de leucocitos.

7. Coloración con tinta china

Uso

Para la visualización de la cápsula de *C. neoformans* se emplea la tinta china, que constituye una suspensión coloidal que no puede penetrar a través de la cápsula, sino que se precipita alrededor de la célula fúngica; de este modo, esta estructura se ve como un halo refringente

alrededor del microorganismo sobre un fondo oscuro o negro.

Fundamento

La cápsula de las levaduras excluye las partículas de tinta china en la preparación, formando una zona clara alrededor de la célula.

Materiales

- *Mechero o incinerador de asas.
- *Asa bacteriológica.
- *Muestra de Líquido cefalorraquídeo.
- *Tinta china marca Pelikan.
- *Placa porta objetos.
- *Placa cubre objetos.
- *Candela o fósforos.

Procedimiento

1. Coloque una gota del sedimento del líquido cefalorraquídeo sobre la placa porta objetos.
2. Agregue una gota de tinta china.
3. Mezcle y coloque la placa cubre objetos.
4. Observe al microscopio con objetivo de 40X.

Lectura

Positiva: Cuando se observan células de levadura rodeadas de una zona clara translúcida.

Negativa: No se observa la zona clara alrededor de las células.

8. Examen directo con KOH

Uso

El KOH (hidróxido de potasio) es el método más ampliamente utilizado para los exámenes directos en micología. Se emplea al 10%, el cual hidroliza los componentes proteicos de los tejidos sin dañar la pared del hongo.

Preparación

- *Reactivo de KOH al 10% 50 mL
- *Tinta Parker azul negra 5.75 mL

Mezclar los reactivos.

Almacenamiento

Guardar en frasco oscuro de plástico a temperatura ambiente.

Procedimiento

1. Colocar la muestra sobre una lámina porta objetos.
2. Adicionar una o dos gotas de KOH.
3. Cubrir con una laminilla.
4. Calentar unos segundos sin dejar hervir.
5. Observar al microscopio con objeto de 10 y 40X.

Lectura

Se observan las diferentes estructuras de hongos como blastoconidias, pseudomicelios, micelios, hifas aseptadas, hifas septadas.

9. Coloración de Giemsa

Uso

Mediante la tinción de Giemsa se realiza el test de Tzank que consiste en el estudio microscópico de las células gigantes multinucleadas en respuesta a una infección por el Herpes Virus, las cuales se obtienen a partir de la base de las vesículas o ampollas.

Procedimiento

1. Fijar la preparación pasando la lámina 2 o 3 veces por el mechero.
2. Cubrir la lámina con colorante de Giemsa por 5 minutos.
3. Lavar con abundante agua.
4. Secar al aire.

Lectura

Leer con objetivo de 100X. Se ve el efecto citopático del virus, observando células abalonadas, con varios núcleos y vacuoladas.

10. Lugol para coloración de protozoos

Uso

Para observar protozoos en muestras de materia fecal

Procedimiento

1. Sobre la placa porta objetos colocar una gota de lugol.
2. Adicionar un poco de materia fecal y disolverla en el lugol.
3. Cubrir con una laminilla y observar al microscopio.

Lectura

Leer con objetivo de 40X, apreciándolas diferentes características de los protozoos.

11. Coloración azul de Lactofenol

Uso

Esta es una excelente tinción para observar las estructuras fúngicas. El fenol mata el hongo mientras que el ácido láctico que contiene la tinción lo preserva; el colorante azul (azul de algodón) tiñe la quitina y celulosa del hongo.

Procedimiento

Montaje a partir de una colonia con hoja de bisturí
Técnica ideal para colonias de consistencia dura y poco micelio aéreo.

1. Coloque una gota de azul de lactofenol sobre el portaobjetos.
2. Con una hoja de bisturí corte la parte distal de la colonia, procure tomar la menor cantidad de agar posible.
3. Llévelo a la gota de azul de lactofenol sobre el portaobjetos.
4. Cubra con una laminilla y examine al microscopio.
5. Observe al microscopio con objetivo de 10 y de 40X.

Montaje a partir de una colonia con cinta engomada
Técnica ideal para colonias de mohos con micelio aéreo

1. Coloque una gota de azul de lactofenol sobre el portaobjetos.
2. Cortar un segmento de cinta adhesiva transparente aproximadamente de 1 cm
3. Usando una pinza, sujete los extremos de la cinta adhesiva.
4. Lleve la cinta sobre la colonia y haga una leve presión sobre ella.
5. Luego lleve la cinta impregnada de la colonia sobre la gota de azul de lactofenol del portaobjetos, y adicione otra gota de azul de lactofenol.
6. Cubra con una laminilla y examine al microscopio.
7. Observe al microscopio con objetivo de 10 y de 40X.

Lectura

Observar las diferentes estructuras (blastoconidias, hifas septadas o aseptadas, microconidias, macroconidias, etc) y su disposición para identificar el hongo respectivo.

12. Bibliografía

Tomado de: Libro Parasitosis humanas. David Botero, Marcos Restrepo. Corporación para Investigaciones Biológicas. 4ta edición, 2005

Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Organización Panamericana de la Salud. 2008

Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Revista iberoamericana de micología 2007. Bilbao segunda edición. J. Pentau-E. Martín-Rubio Calvo.

López LE, Hernández M, Colín C, Ortega S, Cerón G, Franco R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en Discapacidad. Vol. 3, Núm. 1 Enero-Marzo 2014 pp 10-18.

Si este documento se encuentra impreso no se garantiza su vigencia, por lo tanto es copia NO CONTROLADA, la versión actual se encuentra en Isolación

| VERSION | FECHA | RAZON DE LA ACTUALIZACION |
|---------|-------------|---|
| 02 | 22/Sep/2009 | Se adiciona alcance. Se adiciona escala de lectura en la coloración de Ziehl-neelsen. |
| 02 | 08/Ene/2014 | Se revisa instructivo y no es necesario modificarlo. |
| 02 | 10/Feb/2015 | Se revisa y no se modifica |
| 03 | 15/Jul/2016 | Se modifica el procedimiento descrito en la coloración de Ziehl-Neelsen. Se actualiza bibliografía. |
| 04 | 29/Dic/2016 | Se completan los usos de las pruebas y se cambia el procedimiento del azul de lactofenol. |
| 04 | 22/Ene/2018 | Se revisa y no se modifica |
| 04 | 14/Ene/2019 | Se revisa y no se modifica |
| 04 | 28/Ene/2020 | Se revisa y no se modifica |
| 05 | 09/Mar/2020 | Se adiciona coloración para BAAR método de Kinyoun (KY). Esta se adiciona por la pandemia del COVID-19 para evitar riesgos al personal. |
| 05 | 04/Ene/2021 | Se revisa y no se modifica |

| | | |
|----|-------------|---|
| 05 | 14/Ene/2022 | Se revisa y no se modifica. |
| 05 | 03/Ene/2023 | Se revisa y no se modifica. |
| 05 | 11/Ene/2024 | Se revisa y no se modifica. |
| 05 | 20/Ene/2025 | Se revisa y no se modifica. |
| 06 | 01/Abr/2025 | Se estandariza que la Coloración de Ziehl-Neelsen de la sede tesoro se realizara en la sede centro. |



| ELABORO | REVISO | APROBO |
|---|--|---|
| Nombre: Yulime Andrea Monsalve Martinez Cargo: Dirección de Calidad Fecha: 01/Abr/2025 | Nombre: Aleyda Montañó Céspedes Cargo: Bacteriólogo(a) de Microbiología Centro Fecha: 01/Abr/2025 Nombre: María Cristina Luna López Cargo: Bacteriólogo(a) de Microbiología Centro Fecha: 01/Abr/2025 | Nombre: Carlos Gonzalo Robledo Restrepo Cargo: Director General Fecha: 02/Abr/2025 |

COPIA CONTROLADA