


	MANUAL DE OPERACIONES		Código: MOP-SIB-12
	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		Fecha: JUN 15
	SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA		Rev. 02
			Hoja: 1 de 10

MANUAL DE TINCIONES

	Elaboró:	Autorizó:
Puesto	QUÍMICO	JEFE DE LABORATORIO
Firma		

	MANUAL DE OPERACIONES		Código: MOP-SIB-12
	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		Fecha: JUN 15
	SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA		Rev. 02
			Hoja: 2 de 10

1. Propósito

Establecer las técnicas y condiciones para la realización de tinciones utilizadas en el laboratorio como ayuda en el proceso de identificación de microorganismos o como soporte en el diagnóstico.

2. Alcance

El presente documento aplica y es de cumplimiento obligatorio para el personal del Laboratorio de Infectología encargado de la preparación de los reactivos.

3. Responsabilidades

Jefe del Laboratorio de Infectología.- Vigilar y supervisar que el presente manual se cumpla en el personal asignado para dicha tarea. Vigilar que se cuente con el personal, material y apoyo necesario para el cumplimiento de todos y cada uno de los procedimientos dentro del laboratorio de Infectología del Instituto Nacional de Rehabilitación.




Químicos y técnicos del Laboratorio de Infectología.- Aplicar la metodología aquí estipulada con carácter de obligatorio en la realización de tinciones.

4. Tinciones

Tinción de Gram

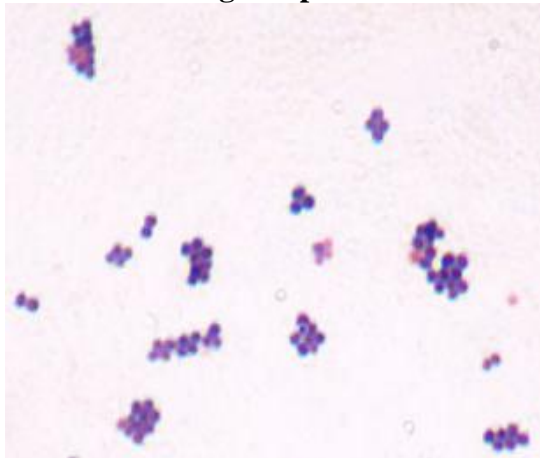
∴ **Principio del método:** Teñir a las bacterias de acuerdo a la cantidad de péptidoglicano de la pared celular.

N°	Actividad
1	El frotis deberá estar bien identificado con el número de muestra correspondiente y la mesa de trabajo a la cual será asignado.
2	Fijar el frotis con metanol y dejar secar.
3	Cubrir el frotis con cristal violeta durante 1 minuto.
4	Enjuagar el frotis con agua de la llave.
5	Cubrir el frotis con lugol durante 1 minuto.
6	Enjuagar el frotis con agua de la llave.
7	Cubrir el frotis con alcohol/acetona durante 10 segundos.
8	Enjuagar el frotis con agua de la llave.

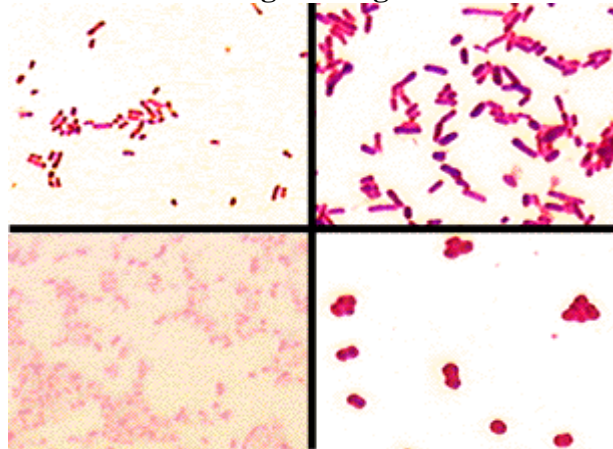
 	MANUAL DE OPERACIONES		Código: MOP-SIB-12
	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		Fecha: JUN 15
	SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA		Rev. 02
			Hoja: 3 de 10

9	Cubrir el frotis con safranina durante 1 minuto.
10	Enjuagar el frotis con agua de la llave.
11	Dejar secar.
12	Observar el frotis en el microscopio.
13	Anotar los resultados observados en la bitácora/software del laboratorio.
14	Resultado: Gram positivo: bacterias de color azul-morado. Gram negativo: bacterias de color rosa-rojo.

Cocos gram positivos





Bacilos gram negativos



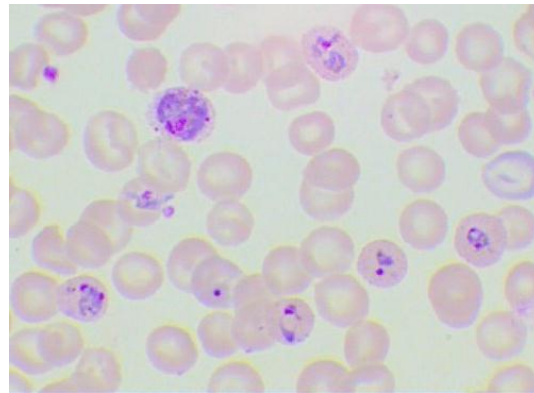
Tinción de Wright

∴ **Principio del método:** Esta tinción se basa en la composición del colorante Wright, que es una mezcla de azul de metileno y eosina. El azul de metileno es un colorante básico que en las células se une a los componentes ácidos que se tiñen de color azul (basófilos). La eosina es un colorante ácido, que se une a los componentes básicos.

N°	Actividad
1	El frotis deberá estar bien identificado con el número de muestra correspondiente y la mesa de trabajo a la cual será asignado.
2	Fijar el frotis con metanol y dejar secar.
3	Cubrir el frotis con el colorante de Wright durante 8 minutos.
4	Agregar unas gotas de buffer de fosfatos o en su defecto con agua de la llave hasta cubrir completamente el frotis procurando no derramar el colorante.
5	Dejar reposar el buffer de fosfatos o agua de la llave durante 10 minutos.
6	Enjuagar el frotis con agua de la llave.
7	Dejar secar.

	MANUAL DE OPERACIONES		Código: MOP-SIB-12
	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		Fecha: JUN 15
	SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA		Rev. 02
			Hoja: 4 de 10

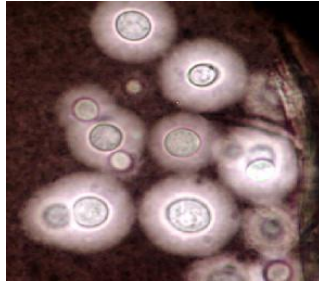
8	Con una torunda con alcohol, remover el exceso de colorante en el lado posterior donde se encuentra la muestra.
9	Observar el frotis en el microscopio.
10	Anotar los resultados observados en la bitácora/software del laboratorio.



Tinción negativa (Tinta china)

∴ **Principio del método:** La tinta china es un colorante que utiliza una suspensión de partículas de carbón coloidal que tiñe el fondo, de tal forma que microorganismos capsulados quedarán sin ser teñidos de ahí su nombre de tinción negativa. Utilizada primordialmente como escrutinio en la búsqueda de *Cryptococcus neoformans*.

N°	Actividad
1	El portaobjetos deberá estar bien identificado con el número de muestra correspondiente y la mesa de trabajo a la cual será asignado.
2	Depositar una gota de líquido cefalorraquídeo.
3	Agregar una gota de tinta china.
4	Mezclar el líquido cefalorraquídeo con la tinta china.
5	Cubrir la preparación con un cubreobjetos
6	Observar al microscopio con el objetivo de 40X.
7	Anotar los resultados observados en la bitácora/software del laboratorio.
8	Resultado: Tinta china positiva: presencia de levaduras translúcidas capsuladas. Tinta china negativa: ausencia de levaduras translúcidas capsuladas.



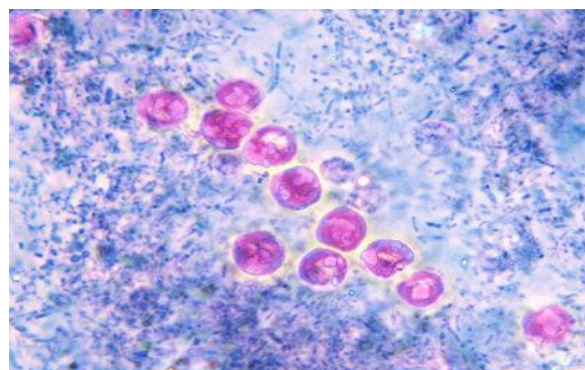
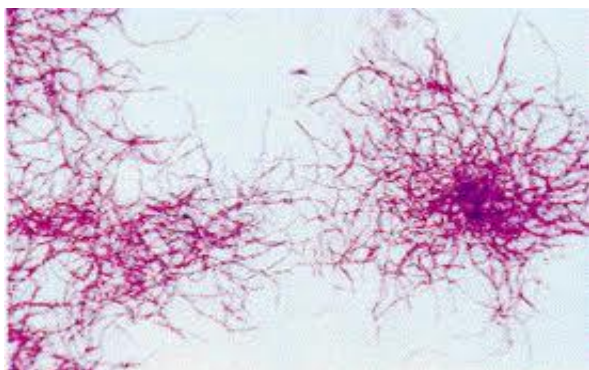
Tinción de Kinyoun

∴ **Principio del método:** Determinar si un microorganismo tiene en su pared celular ácidos micólicos, detectables al retener el colorante carbol-fucsina y resistiendo el lavado con alcohol-ácido.

N°	Actividad
1	El frotis deberá estar bien identificado con el número de muestra correspondiente y la mesa de trabajo a la cual será asignado.
2	Fijar el frotis con metanol y dejar secar.
3	Cubrir el frotis con carbol-fucsina durante 5 minutos.
4	Enjuagar el frotis con agua de la llave.
5	Cubrir el frotis con alcohol-ácido durante 2 minutos.
6	Enjuagar el frotis con agua de la llave.
7	Cubrir el frotis con verde brillante, verde de malaquita o azul de metileno durante 2-3 minutos. Coccidias (3 minutos) Actinomicetos (2 minutos)
8	Enjuagar el frotis con agua de la llave.
9	Dejar secar.
10	Observar el frotis en el microscopio.
11	Anotar los resultados observados en la bitácora/software del laboratorio.
12	Resultado: Kinyoun positivo: bacterias de color rojo. Kinyoun negativo: bacterias teñidas del color de la contratación utilizada.

Nocardia spp.

Cyptosporidium spp.

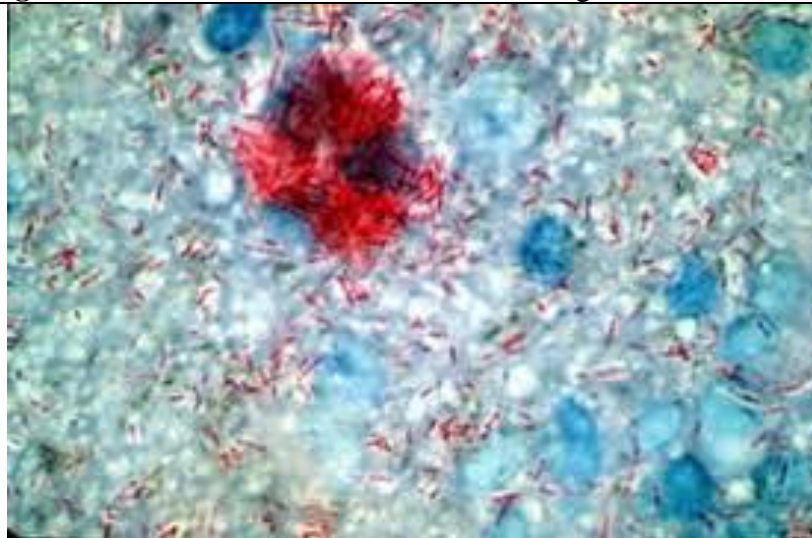


Tinción de Ziehl-Neelsen

∴ **Principio del método:** Esta tinción se basa en el uso de la fucsina disuelta en fenol y aplicación de calor. Para que las micobacterias se tiñan es necesario que el colorante atraviese la pared celular, esto se logra con el disolvente orgánico y el calor, esta se funde para que penetre el colorante, posteriormente al dejar enfriar la pared celular solidifica y no permite la salida del colorante, finalmente se elimina el exceso de colorante con una mezcla de alcohol-ácido a la cual las micobacterias son resistentes.

N°	Actividad
1	El frotis deberá estar bien identificado con el número de muestra correspondiente y la mesa de trabajo a la cual será asignado.
2	Fijar el frotis con metanol y dejar secar.
3	Cubrir el frotis con carbol-fucsina. Calentar hasta la emisión de vapores durante 8 minutos. Si el colorante se comienza a secar, se deberán agregar unas gotas de colorante nuevamente.
4	Enjuagar el frotis con agua de la llave.
5	Cubrir el frotis con alcohol-ácido durante 2 minutos.
6	Enjuagar el frotis con agua de la llave.
7	Cubrir el frotis con azul de metileno durante 5 minutos.
8	Enjuagar el frotis con agua de la llave.
9	Dejar secar.
10	Observar el frotis en el microscopio.
11	Anotar los resultados observados en la bitácora/software del laboratorio.



12	Resultado: Microorganismos ácido-alcohol resistentes: microorganismos de color rojo. Microorganismos ácido-alcohol sensibles: microorganismos del color de la contratinción.
-----------	--



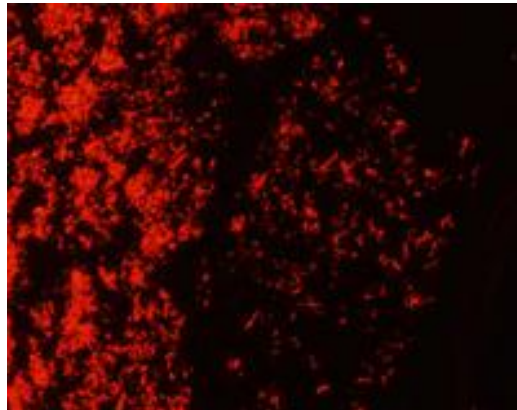
Tinción de Auramina/Rodamina

∴ *Principio del método:* Ésta tinción se basa en los ácidos micólicos presentes en la pared de las micobacterias y que son susceptibles de ser teñidos por colorantes fluorescentes.

N°	Actividad
1	El frotis deberá estar bien identificado con el número de muestra correspondiente y la mesa de trabajo a la cual será asignado.
2	Fijar el frotis con metanol y dejar secar.
3	Cubrir el frotis con Auramina/Rodamina durante 15 minutos.
4	Enjuagar el frotis con agua de la llave.
5	Cubrir el frotis con alcohol-ácido durante 3 minutos.
6	Enjuagar el frotis con agua de la llave.
7	Cubrir el frotis con permanganato de potasio durante 5 minutos.
8	Enjuagar el frotis con agua de la llave.
9	Dejar secar.
10	Observar el frotis en el microscopio de fluorescencia a 40X
11	Anotar los resultados observados en la bitácora/software del laboratorio.

	MANUAL DE OPERACIONES		Código: MOP-SIB-12
	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		Fecha: JUN 15
	SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA		Rev. 02
			Hoja: 8 de 10




12	<p>Resultado:</p> <p>Auramina/Rodamina positiva: microorganismos de color naranja intenso y de forma bacilar,.</p> <p>Auramina/Rodamina negativa: Ausencia de color naranja intenso.</p>
-----------	--



Tinción de azul de lactofenol

∴ **Principio del método:** El ácido láctico junto con el fenol inactivarán al microorganismo pero sin dañar su estructura de tal modo que se podrán visualizar sin interferencias lo cual permitirá determinar la presencia de hongos filamentosos y de esta manera identificar las diferentes especies.

N°	Actividad
1	El portaobjetos deberá estar bien identificado con el número de muestra correspondiente y la mesa de trabajo a la cual será asignado.
2	Depositar en el centro del portaobjetos una gota de azul de lactofenol
3	Adherir un pedazo de cinta adhesiva en una asa micológica previamente esterilizada y enfriada y tomar muestras de la colonia.
4	Colocar con cuidado la cinta adhesiva sobre la gota de azul de lactofenol.
5	Colocar otra gota de azul de lactofenol sobre la impronta.
6	Cubrir la impronta con un cubreobjetos.

 	MANUAL DE OPERACIONES		Código: MOP-SIB-12
	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		Fecha: JUN 15
	SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA		Rev. 02
			Hoja: 9 de 10

7	Observar al microscopio con el objetivo seco fuerte (40X). Observar al microscopio con el objetivo seco fuerte (40X) y buscar la presencia de elementos fúngicos.
---	---



Clarificación con KOH al 10%



∴ *Principio del método:* la acción queratolítica del KOH permite digestión de piel y faneras liberando los probables elementos fúngicos.

N°	Actividad
1	El portaobjetos deberá estar bien identificado con el número de muestra correspondiente y la mesa de trabajo a la cual será asignado.
2	Depositar en el centro del portaobjetos una gota de KOH al 10%.
3	Depositar la muestra de tejido o faneras que se desee digerir.
4	Dejar reposar la preparación aproximadamente 5 minutos. Si se desea acelerar el proceso se puede calentar la preparación sin llegar a ebullición. En caso de que el reactivo se seque, se deberán agregar unas gotas extras de reactivos.
5	Colocar a la preparación un cubreobjetos.
6	Observar al microscopio con el objetivo seco fuerte (40X) y buscar la presencia de elementos fúngicos.

4. Glosario

Azul de algodón: Tinción utilizada para la visualización de características de hongos filamentosos.

Tinción de Gram: Tinción diferencial para la visualización de bacterias por las características de su pared y membrana celular.

	MANUAL DE OPERACIONES		Código: MOP-SIB-12
	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		Fecha: JUN 15
	SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA		Rev. 02
			Hoja: 10 de 10

Tinción de Ziehl-Neelsen: Tinción diferencial para la visualización de bacterias con gran cantidad de ácidos micólicos en su pared celular.

Tinción de Wright: Tinción que permite diferenciar entre varios tipos celulares de la sangre.

5. Control de cambios

Revisión	Descripción del cambio	Fecha
00	Incorporación al sistema de Gestión de la Calidad	Agosto 2012
01	Revisión y cambio de formato	Julio 2014
02	Actualización de imagen institucional	JUN 15