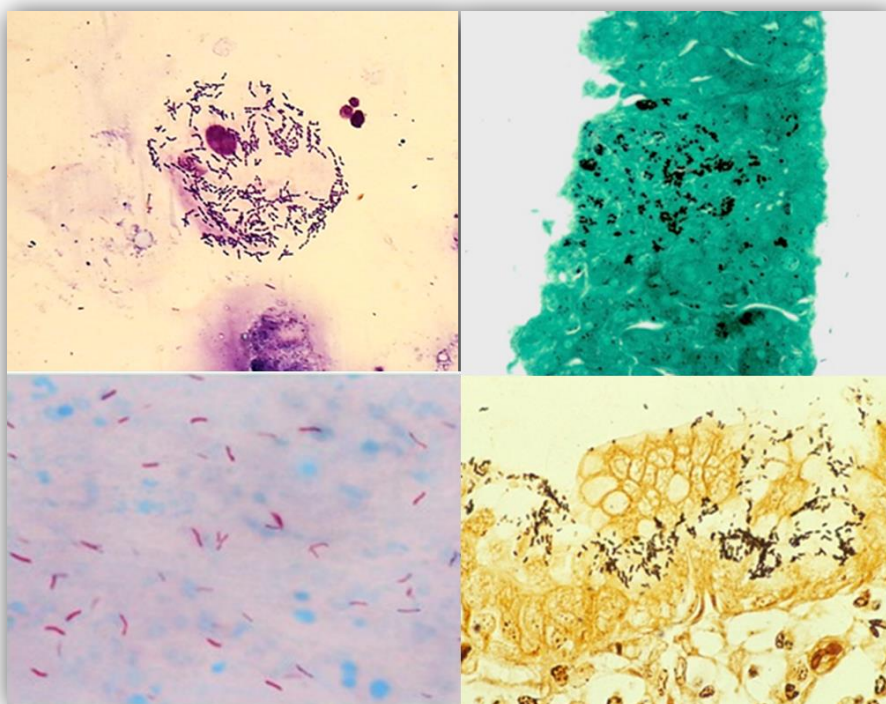


GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS
UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO
SUB-UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO – ANATOMÍA PATOLÓGICA

**“GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA
PARA MICROORGANISMOS”**



Elaborado por: Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico – Anatomía Patológica	Revisado por: <ul style="list-style-type: none">• Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento• Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico• Unidad de Gestión de la Calidad	Aprobado por: Dra. Elizabeth Zulema Tomas Gonzáles de Palomino Directora General del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja
---	--	---

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

INDICE

I.	Título	3
II.	Finalidad	3
III.	Objetivos	3
a.	Objetivos Generales.....	3
b.	Objetivos Específicos.....	3
IV.	Ámbito de aplicación	3
V.	Nombre del Procedimiento a Estandarizar y Código CPMS	3
VI.	Consideraciones Generales	4
a.	Definiciones Operativas	4
1.	Definición del Procedimiento	4
2.	Aspectos Epidemiológicos importantes.....	4
3.	Consentimiento Informado	4
b.	Conceptos Básicos	4
c.	Requerimientos Básicos.....	7
VII.	Consideraciones Específicas.....	9
a.	Descripción del Procedimiento	9
b.	Indicaciones.....	15
1.	Indicaciones absolutas	15
2.	Indicaciones relativas	15
c.	Riesgos o Complicaciones Frecuentes:.....	15
d.	Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes:.....	15
e.	Contraindicaciones.....	16
VIII.	Recomendaciones	16
IX.	Autores, Fecha y Lugar.....	16
X.	Anexos.....	17
XI.	Bibliografía.....	28

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS**I. TÍTULO**

Guía de procedimiento: Histoquímica para Microorganismos

II. FINALIDAD

Contribuir con un instrumento de apoyo y de mejora continua en los servicios de salud del INSN-SB garantizando un procesamiento óptimo y de calidad de las muestras que requieren histoquímica para microorganismos, para un diagnóstico definitivo.

III. OBJETIVOS**a. Objetivo General:**

Estandarizar los procedimientos en la técnica de Histoquímica para microorganismos y uniformizar el proceso para asegurar la calidad del mismo.

b. Objetivo Específico

- Establecer los lineamientos correctos para un adecuado procesamiento de las muestras que requieren Histoquímica para microorganismos
- Proporcionar de forma ordenada, secuencial y detallada las operaciones que se deben aplicar a los procedimientos para la identificación de microorganismo de muestras solicitadas para estudio histoquímico.

IV. ÁMBITO DE APLICACIÓN

- La presente Guía de Procedimiento: Histoquímica para Microorganismos tiene como ámbito de aplicación al área de Inmunohistoquímica de Anatomía Patológica del INSN-SB.

V. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO Y CÓDIGO CPMS

- Histoquímica determinativa para identificar microorganismos - código CPMS: 88313.03

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

VI. CONSIDERACIONES GENERALES

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

Las técnicas de histoquímica se basan, en la tinción específica de elementos celulares o tejidos, mediante el empleo de reacciones químicas coloreadas, permitiendo la identificación y localización de componentes orgánicos, químicos o de microorganismos. Dentro de las técnicas para identificación de microorganismos, tenemos:

- Ziehl Neelsen
- Auramina O
- Grocott
- Gram
- Warthin Starry
- Giemsa

2. Aspectos epidemiológicos importantes

No aplica

3. Consentimiento informado

No aplica

b. Conceptos Básicos

- **Coloración de Ziehl-Neelsen:** Esta técnica es un tipo de coloración diferencial, lo que implica el uso de distintos colorantes con la finalidad de crear contraste entre las estructuras que se desean observar, diferenciar y posteriormente identificar. La tinción de Ziehl-Neelsen sirve para identificar ciertos tipos de microorganismos.

El fundamento de esta técnica de tinción se basa en las propiedades de la pared celular de estos microorganismos. La pared está formada por un tipo de ácidos grasos llamados ácidos micólicos; estos se caracterizan por presentar cadenas muy

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

largas. Cuando los ácidos grasos presentan estructuras muy largas, estos pueden retener los colorantes con mayor facilidad².

En la tinción de Ziehl-Neelsen se utiliza el compuesto fenólico carbol fucsina, un colorante básico. Este tiene la capacidad de interactuar con los ácidos grasos de la pared celular, la cual es de textura cerosa a temperatura ambiente. La tinción con carbol fucsina es mejorada en presencia de calor, debido a que la cera se derrite y las moléculas de colorante se mueven con mayor rapidez hacia el interior de la pared celular. El ácido que se usa posteriormente sirve para decolorar las células que no fueron teñidas porque su pared no era lo suficientemente afín al colorante; por lo tanto, la fuerza del decolorante ácido es capaz de eliminar el colorante ácido. Las células que resisten esta decoloración se llaman ácido-resistentes. Después de la decoloración de la muestra, esta se contrasta con otro colorante llamado colorante secundario. Generalmente se utiliza el azul de metileno o el verde de malaquita².

El colorante secundario tiñe el material de fondo y, en consecuencia, crea contraste a las estructuras que fueron teñidas en el primer paso. Solo las células decoloradas absorben el segundo colorante (contra-tinción) y toman su color, mientras que las células ácido-resistentes conservan el color rojo².

Se emplea para detectar la presencia de BAAR (Bacilos Acido-Alcohol Resistentes), como diagnóstico de enfermedades infecciosas producidas por:

- a) Micobacterias: *Micobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*.
 - b) Bacterias del género *Nocardia* → Nocardiosis y Micetoma actinomicótico (micosis subcutánea).
- **Coloración Auramina O:** Tinción de micobacterias según Hagemann-Hermann por unión no específica del colorante fluorescente a un sustrato. El mecanismo de la tinción fluorescente es comparable con la tinción clásica de Ziehl-Neelsen².

En vez de utilizar la fucsina, utiliza auramina fenólica, la cual al igual que la fucsina tiene la capacidad de unirse a los lípidos de la pared de la micobacteria. Las bacterias ácido resistentes teñidas con fluorocromos son coloreadas de color amarillo brillante².

La coloración de contraste utilizada en esta tinción es el permanganato de potasio, el cual produce un fondo negro de contraste².

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

- **Coloración de Grocott:** El Método de plata Grocott Gomori se utiliza para demostrar hongos. Las paredes celulares de los hongos son ricas en polisacáridos que, cuando se oxida por el ácido periódico, se convierte en aldehídos. Estos grupos reducen directamente los iones de plata de la solución de metanamina de plata a plata metálica. El Tiosulfato de sodio se utiliza para fijar la plata metálica y también retirar la plata no reducida¹.

- **Coloración Gram:** La tinción Gram es uno de los procesos más utilizados a la hora de determinar al microscopio óptico la filogenia de un microorganismo. Siendo una de las primeras pruebas que se hacen para clasificar a un posible patógeno.

El cristal violeta, colorante catiónico, penetra en todas las células bacterianas, Gram positivas y negativas, a través de la pared bacteriana. El Lugol es un compuesto que actúa de mordiente, haciendo que el cristal violeta se fije con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana. La mezcla de alcohol-acetona que se agrega, sirve para realizar la decoloración. 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 safranina o la fucsina. Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen violetas².

- **Coloración de Warthin Starry:** Esta técnica se basa en la capacidad de ciertas bacterias y espiroquetas de unirse a iones plata de la solución. Esta reacción es una reacción *argyrophilic* similar a la tinción especial de reticulina. En la tinción de Warthin-Starry, el tejido se sensibilizó antes de la aplicación del complejo de plata. Se aplica una solución acuosa de nitrato de plata se combina con el agente reductor, y se genera un complejo de plata diamina³.
- **Coloración Giemsa:** Es un método habitual para el examen de frotis sanguíneos, cortes histológicos y otro tipo de muestras biológicas; como tinción diferencial de las células hemáticas. Este método tiene utilidad sobre todo para poner de manifiesto las Rickettsias localizadas dentro de la célula huéspedes. La coloración de Giemsa se emplea también para teñir frotis de sangre en el examen para protozoos como *Tripanosoma* sp. La técnica de Giemsa está formada por varios

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

colorantes: los tintes neutros utilizados combinan el azul de metileno como tinte básico y la eosina como tinte ácido, lo que da una amplia gama de colores. El azul de metileno es un colorante metacromático, de ahí que muchas estructuras se tiñan de púrpura y no de azul. El pH de la solución de coloración es crítico y se debe ajustar idealmente según diversos fijadores. La gama del pH debe estar entre 6.4 y 6.9 ².

c. Requerimientos Básicos

Equipos Biomédicos

- Micrótomos
- Baño de flotación
- Estufa
- Microscopio

Materiales no fungibles

- Pinzas
- Canastillas

Materiales Fungibles

- Agua destilada
- Láminas
- Pipetas Pasteur
- Láminas cargadas
- Tips
- Lamillas
- Guantes de nitrilo
- Pizeta
- **Coloración de Ziehl-Neelsen:**
 - Fucsina básica fenicada
 - Azul de metileno al 3%
 - Alcohol ácido 1%

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS**• Coloración Auramina O:**

- Auramina O al 0.1%
- Alcohol ácido al 0.5%
- Permanganato de potasio al 0.5%

• Coloración de Grocott:

- Ácido Peryódico al 1%
- Metanamina al 3%
- Nitrato de plata al 10%
- Bórax al 5%
- Cloruro de Oro
- Tiosulfato de Sodio al 5%
- Light Green

• Coloración Gram:

- Cristal Violeta al 1%
- Lugol
- Alcohol acetona
- Safranina al 1%

• Coloración de Warthin Starry:

- Agua acidificada
- Nitrato de plata 1 %
- Gelatina al 5%
- Hidroquinona 0.15%
- Nitrato de plata 2%

• Coloración Giemsa:

- Solución de Ácido Acético
- Giemsa 0.12%

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS**VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS****a. Descripción del Procedimiento****a.1 Recepción de Solicitud**

- Recepcionar la solicitud de estudios especiales para Histoquímica. **(Anexo 2)**
- Verificar el código AP de la solicitud (Ej. 20PQ-150) y las coloraciones especiales solicitadas. **(Anexo 2)**
- Registrar en la bitácora del área de histoquímica lo solicitado. **(Anexo 3)**

a.2 Procesamiento para Prueba de Histoquímica**a.2.1. Protocolo para procesamiento de muestras para identificar microorganismos.**

Para procesamiento de las coloraciones de Zielh Neelsen y Auramina, lavar previamente láminas para cortes **(Anexo N°4)**. Cortar los bloques de parafina en el micrótopo **(Anexo N°5)**. Registrar en SISGALENPLUS los casos con las coloraciones especiales solicitadas. Desparafinar e hidratar las láminas antes de la coloración **(Anexo N°6)**. Terminado el procedimiento llenar el cuaderno de entrega de láminas de HQ a microscopía **(Anexo N 8)** y entregar láminas al patólogo.

NOTA: Revisar previamente el **Anexo 7** preparaciones de reactivos de todas las coloraciones.

A. Coloración de Zielh Neelsen**Procedimiento:**

- 1.1 Desparafinar e hidratar lámina. **(Anexo 6)**
- 1.2 Agregar fucsina básica por 20 minutos.
- 1.3 Diferenciar con alcohol ácido hasta retirar el exceso de colorante.
- 1.4 Lavar con agua destilada.
- 1.5 Contrastar con Azul de metileno por 10 segundos.
- 1.6 Lavar
- 1.7 Deshidratar y montar. **(Anexo 8)**

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

Resultado:

- Los BAAR: **color rojo**
- Fondo (contraste): **color azul**.

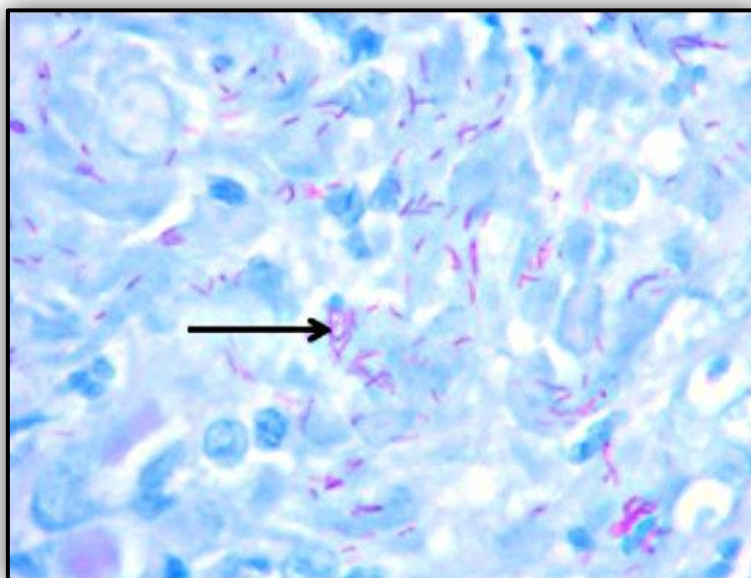


Fig. 1 *Mycobacterium tuberculosis*

Fuente: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmp068015>

B. Coloración Auramina O**Procedimiento:**

- 1.1 Desparafinar e hidratar lámina (**Anexo 6**)
- 1.2 Agregar Auramina O por 15 minutos.
- 1.3 Diferenciar con alcohol ácido hasta retirar el exceso de colorante.
- 1.4 Lavar con agua destilada.
- 1.5 Contrastar con Permanganato de Potasio por 2 minutos.
- 1.6 Lavar
- 1.7 Deshidratar y montar (**Anexo 8**)

Resultados

- Los BAAR: **presencia de fluorescencia**
- Fondo de muestra (contraste): **color pardo amarillento**.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

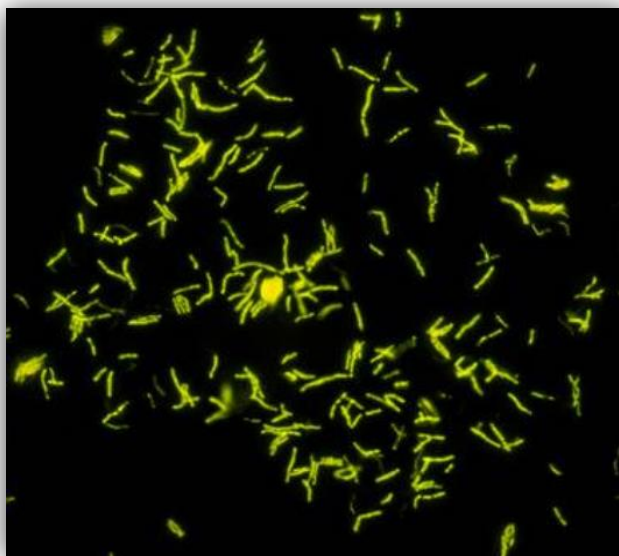


Fig. 2 *Mycobacterium tuberculosis*

Fuente: <https://www.diapath.com/product/auramine-stain-010316-2636>

C. Coloración de Grocott

Procedimiento:

- 1.1 Desparafinar e hidratar hasta agua destilada. (Anexo 6)
- 1.2 Agregar Ácido peryódico al 1% por 10 minutos.
- 1.3 Lavar con agua destilada.
- 1.4 En un recipiente limpio agregar la **Solución de Trabajo**, colocar la lámina dentro y dejar en estufa por 50 minutos.
- 1.5 Retirar y revisar la muestra, si falta intensidad en la reacción colocar por 5 minutos más.
- 1.6 Lavar con agua destilada.
- 1.7 Agregar Cloruro de oro hasta retirar el excedente y el fondo de la muestra este limpio.
- 1.8 Agregar Tiosulfato de Sodio al 5% por 2 minutos aproximadamente. Revisar la muestra al microscopio.
- 1.9 Agregar Light Green por 30 segundos a 1 minuto.
- 1.10 Deshidratar y montar. **(Anexo 8)**

Resultados

- Elementos fúngicos: **negro**
- Fondo de muestra (contraste): **verde**

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

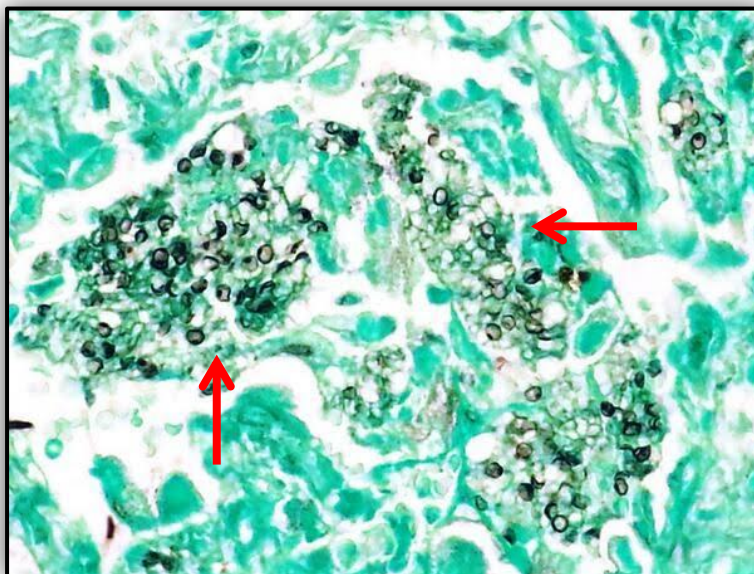


Fig. 3 *Pneumocystis jirovecii* en muestra de Pulmón

Fuente: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213294517300728>

D. Coloración Gram

Procedimiento:

- 1.1 Desparafinar e hidratar hasta agua destilada. **(Anexo 6)**
- 1.2 Agregar Cristal violeta por 1 minuto.
- 1.3 Lavar con lugol o agua destilada.
- 1.4 Agregar lugol por 1 minuto.
- 1.5 Lavar con agua destilada.
- 1.6 Diferenciar con alcohol acetona, hasta retirar el excedente.
- 1.7 Agregar safranina o fucsina básica por 1 minuto o según la concentración del colorante.
- 1.8 Lavar con agua destilada.
- 1.9 Deshidratar y montar. **(Anexo 8)**

Resultados

- Microorganismos Gram positivos: **violeta azulado**
- Microorganismos Gram negativos: **fucsia a rojo**
- Fondo de muestra (contraste): **rosa**

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

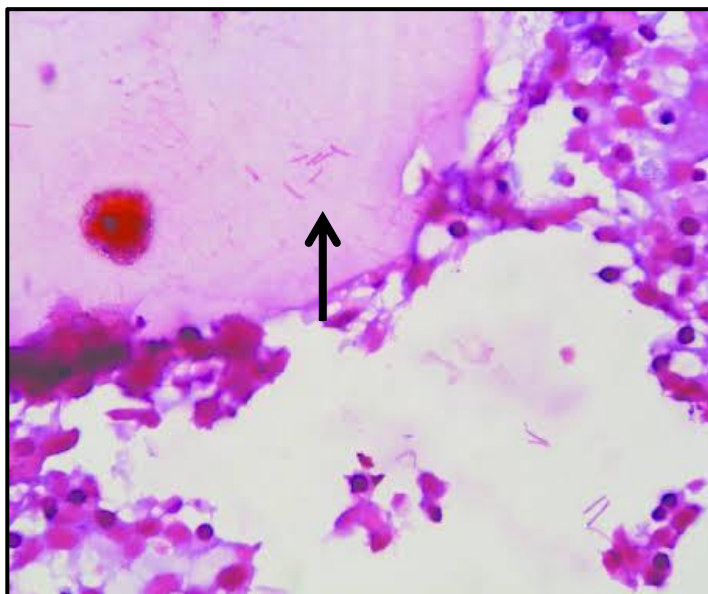


Fig. 4 Bacilos Gram negativos en Biopsia de Médula

Fuente: <https://www.researchgate.net/figure/Figura-7>

E. Coloración de Warthin Starry

Procedimiento:

- 1.1 Desparafinar e hidratar los cortes hasta agua destilada. **(Anexo 6)**
- 1.2 Impregnar con solución de nitrato de plata al 1% en estufa a 60°C por 20 minutos.
- 1.3 Preparar la SOLUCIÓN DIARIA PARA EL REVELADO y sin mezclar, colocarlas en la estufa por 20 minutos junto con la solución anterior.
- 1.4 Retirar de la estufa las soluciones de revelado, luego mezclarlas.
- 1.5 Retirar de la estufa la solución de nitrato de plata y sin lavar poner los cortes en la solución reveladora. Los cortes se tornan amarillo claro y/o café dorado en aproximadamente 1 a 2 minutos.
- 1.6 Sacar las láminas para detener la reacción y lavar en agua caliente (para sacar el exceso de gelatina)
- 1.7 Dejar secar al aire y luego montar. **(Anexo 8)**

Resultados

- Espiroquetas: **negro**
- Fondo de muestra (contraste): **café amarillento claro**

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

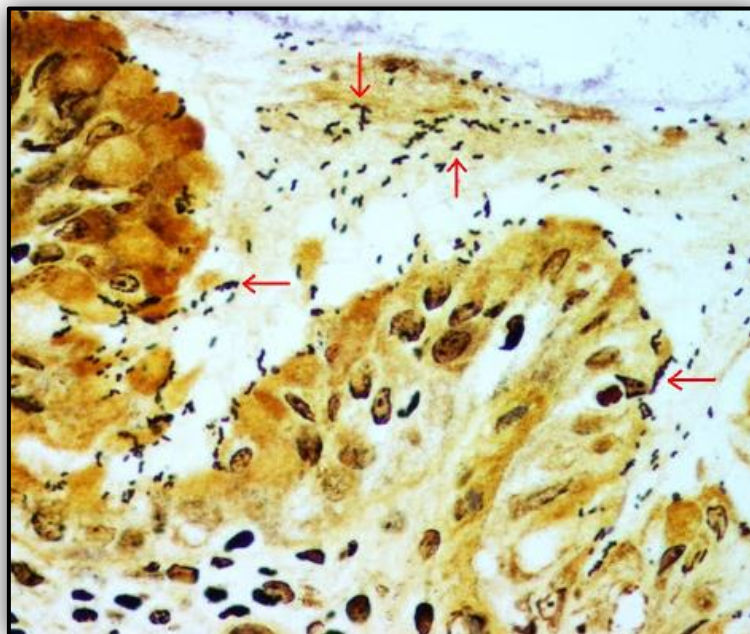


Fig. 5 Helicobacter Pylori en muestra gástrica

Fuente: <http://anatpat.unicamp.br/bitgihelicobacter.html>

F. Coloración Giemsa

Procedimiento:

- 1.1 Desparafinar e hidratar hasta agua destilada. **(Anexo 6)**
- 1.2 Cubrir la lámina con la SOLUCIÓN DE TRABAJO de Giemsa por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 1.3 Lavar con agua destilada.
- 1.4 Deshidratar y montar. **(Anexo 8)**

Resultados

- Citoplasma: **rosa**
- Citoplasma de monocitos y linfocitos: **azul**
- Núcleos: **azul**
- Eritrocitos, gránulos de eosinófilos: **rosado**
- Gránulos de basófilos: **purpura**
- Núcleos de leucocitos: **purpura**
- Bacterias y parásitos: **azul**

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

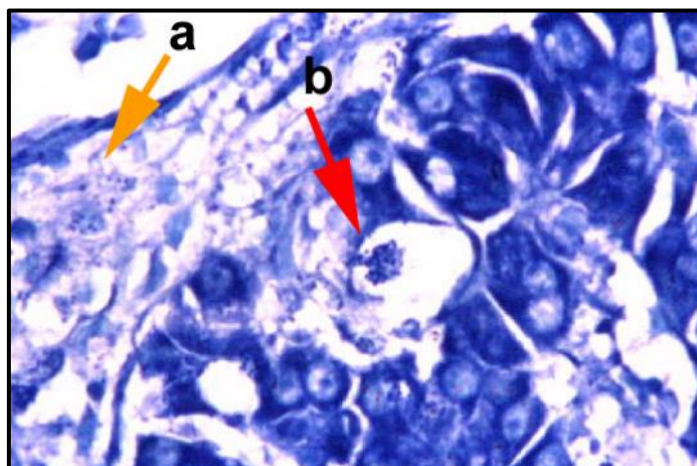


Fig. 6 Agente Rikettsial dentro de una vacuola citoplasmática en muestra de hígado.

Fuente: <https://www.google.com.pe/search?q=Agente%20Rickettsial>

a.3 Entrega de Láminas

- Entregar láminas al Médico Patólogo correspondiente (**Anexo 9**).
- Entregar los bloques de parafina a archivo.

b. Indicaciones

La Histoquímica para Microorganismos es una técnica utilizada como apoyo al diagnóstico Médico especializado.

Es indicada para la identificación de diferentes microorganismos causantes de enfermedades infecciosas como la tuberculosis, micosis entre otras.

c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes

- Desprendimiento de las muestras de las láminas: para evitarlo se debe secar bien las láminas y desparafinar con los tiempos correspondientes.

d. Riesgos o Complicaciones Poco Frecuentes

- Verificar las fechas de preparación de los reactivos a utilizar, para evitar una mala reacción en la coloración.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

e. Contraindicaciones

- Muestras ya coloreadas están contraindicadas para realizar estas técnicas pues éstas no van a colorearse de forma adecuada.

VIII. RECOMENDACIONES

- La fijación debe ser suficiente para que la muestra quede bien fijada pero no excesiva para evitar deterioros o alteraciones del tejido.
- Verificar que se cuente con todos los reactivos necesarios para la coloración y respetar los tiempos establecidos.
- La validación de los resultados de Histoquímica se debe realizar con la observación de la reacción de los controles de calidad positivos de cada uno de las coloraciones solicitadas.
- Los resultados de Histoquímica deben ser correlacionados con los resultados obtenidos en la coloración de hematoxilina y eosina, así como estudios de Inmunohistoquímica, Inmunofluorescencia y microscopia electrónica, si fuera necesario, para un adecuado diagnóstico.
- Cada vez que se cambie de casa comercial y/o lote de reactivos de determinada coloración pueden presentarse cambios en los protocolos estandarizados por lo cual este debe ser estandarizado nuevamente para un óptimo resultado.

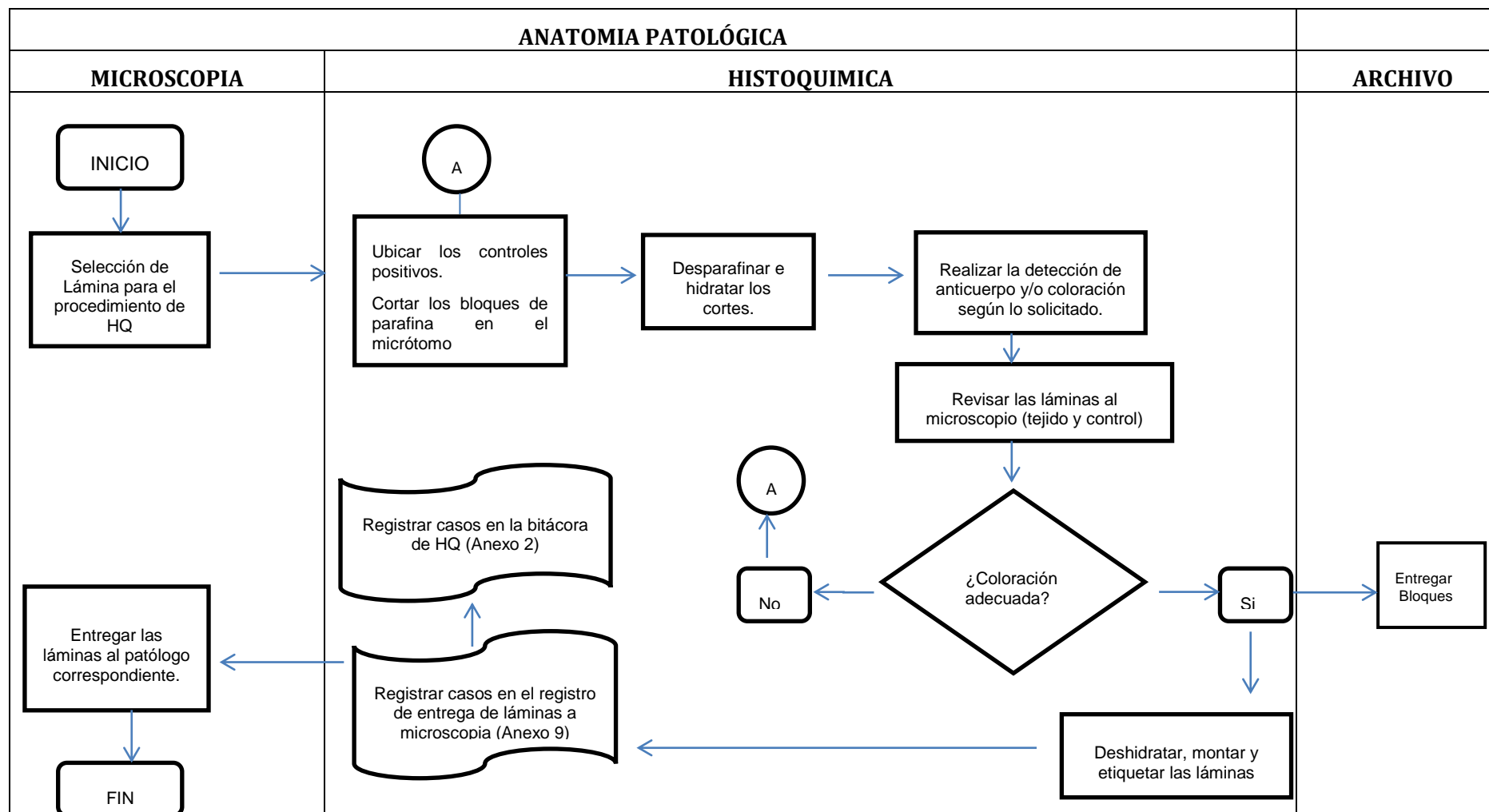
IX. AUTORES, FECHA Y LUGAR

- Ejecutor Responsable:
Licenciado en Tecnología Médica de la Sub-Unidad de Soporte al Diagnóstico- Anatomía Patológica.
- Fecha y lugar del procedimiento:
Agosto 2020, Instituto Nacional Del Niño San Borja/ Sub-Unidad de Soporte al Diagnóstico- Anatomía Patológica
- Vigencia: 2 años, a partir de su aprobación con Resolución Directoral.
- Lista de Autores y correos electrónicos:
Lic. T.M. Susan Ramos Meza
sramosm@insnsb.gob.pe

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

X. ANEXOS

Anexo N°1: Flujograma de Histoquímica



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS
Anexo N°2: Solicitud de Estudio de Coloraciones Especiales

PERÚ
Ministerio de Salud


SOLICITUD DE ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA	DATOS DEL PACIENTE				CODIGO AP:
	APELLIDOS Y NOMBRES				
	EDAD	SEXO	SERVICIO	HC	FECHA DE SOLICITUD

INMUNOHISTOQUIMICA

ANTICUERPO	ANTICUERPO	ANTICUERPO	ANTICUERPO
Actina	CD33	EBV	Myosin Smooth
AFP	CD34	E-cadherina	MyoD1
Bcl2	CD35	EMA	Neurofilamento
Bcl6	CD43	FLI-1	NSE
Calretinina	CD45	GFAP	OCT-4
Cytomegalovirus	CD56	GLUT1	Olig-2
CD3	CD61	GlycophorinA	Pax 5
C4d	CD68	GranzymeB	PLAP
CD1a	CD79a	HCG	Podoplanin
CD4	CD99	HLA-DR	p53
CD5	CD117 c-kit	Herpes Simplex virus	SV40
CD7	CD138	Melanosoma (HMB-45)	Synaptophysin
CD8	CD163	IgG4 Rmb	S-100
CD10	CD246 (ALK)	IgM	TDT
CD13	CEA	INI-1	TIA-1
CD15	CK CoCktail (AE1-AE3)	Kappa light chain	Vimentin
CD19	CK5 Rmb	Ki-67	Von Willebrand
CD20	CK7	Lambda light chain	WT-1
CD21	CK19	Langerin	
CD23	CK20	Neu-N	
CD30	Collagen Type IV	Mieloperoxidasa	
CD31	Desmin	Myogenin	

OBSERVACIONES:

INMUNOFLUORESCENCIA:

DIRECTA	INDIRECTA
ANTICUERPO	ANTICUERPO
C1Q	C4D
C3c	COLAGENO IV
IGA	COLAGENO VII
IG G	CK14
IG M	INTEGRINA B-4
KAPPA	LAMININA
LAMBDA	PLECTINA
FIBRINOGENO	

MICROSCOPIA ELECTRONICA:

Microscopia Electrónica; Diagnóstica Pieza Menor
Microscopia Electrónica; Diagnóstica Pieza Mayor
Microscopia Electrónica; Diagnóstica Pieza Recuperada.
Microscopia Electrónica; Diagnóstica Líquidos, Suspensiones y Otros

HISTOQUIMICA

AURAMINA	DESPIGMENTACION DE MELANINA	PERLS	VERHOEFF
ALCIAN BLUE	FONTANA DE MASSON	RETICULINA	VON KOSSA
AZUL DE TOLUIDINA	METEN PLATA	RODANINA	WARTHIN STARRY
CRISTAL VIOLETA	OIL RED	ROJO CONGO	ZIELH NEELSEN
GIEMSA	PAS	SUDAN III o IV	
GRAM	PAS / ALCIAN BLUE	TRIC MASSON	
GROCOTT	PAS DIASTASA	VAN GIESON	

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

Anexo 3: Bitácora de Histoquímica

[illegible]

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS**Anexo N°4:****Lavado de Láminas**

1. Lavar cada una de las láminas a procesar con detergente y con ayuda de una gasa enjuagar con abundante agua de caño.
2. Sumergir las láminas con lejía al 10% por 5 minutos
3. Sumergir en agua caliente por 10 minutos.
4. Sumergir en alcohol 96° por 10 minutos.
5. Retirar y secar cada lámina con gasa.

Anexo N°5:**Corte Histológicos en Micrótomos**

1. Ubicar los bloques de parafina de la muestra problema y controles positivos.
Enfriar los bloques en la plancha de enfriamiento -20°C.
2. Rotular las láminas negativas o cargadas con los marcadores de estudio solicitado.
3. Realizar los cortes de la muestra problema en el micrótomos con un grosor de 2 micras.
4. Recoger el corte de tejido con una pinza y colocar en un recipiente con agua fría.
5. Recoger con una lámina el corte de tejido y colocar en baño de flotación.
Temperatura del agua: 50°C +/- 2 °C.
6. Recoger nuevamente el corte de tejido con una inclinación de 45°, evitar formar burbujas. Centrar el tejido en la lámina y dejar secar por 10 a 15 minutos.
7. Repetir los pasos desde el punto N°3 al N°6 para los controles positivos y colocar los cortes en la parte inferior de la muestra problema.
8. Registrar en Galenos los casos con las pruebas solicitadas.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS**Anexo N°6:****Desparafinado e Hidratado de Láminas.**

1. Colocar las láminas en la estufa (70°C).
2. Dejar por un máximo de 50 minutos para que se adhiera el tejido a la lámina.
3. Tratar los cortes en xilol 1, durante 5 minutos.
4. Regresar a la estufa por 5 minutos.
5. Tratar los cortes en xilol 2, durante 5 minutos.
6. Tratar los cortes en alcohol absoluto 1, durante 1 minuto.
7. Tratar los cortes en alcohol absoluto 2, durante 5 minutos.
8. Tratar los cortes en alcohol corriente 96°, durante 1 minuto.
9. Lavar en agua corriente 1 minuto.

Anexo N°7:**Preparación de Reactivos****1) COLORACIÓN DE ZIEHL-NEELSEN:**

- Fucsina básica fenicada
 - Fenol derretido _____ 2.5 mL
 - Etanol Absoluto _____ 5 mL
 - Fucsina Básica _____ 0.5 gr
 - Agua destilada _____ 50 mL
- Azul de metileno al 3%
 - Azul de metileno _____ 3 gr
 - Agua destilada _____ 100 mL
- Alcohol ácido 1%
 - Ácido clorhídrico HCL _____ 1 mL
 - Etanol 70% _____ 100 mL

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

2) COLORACIÓN AURAMINA O:

- Permanganato de potasio al 0.5%
 - Permanganato de potasio _____ 0.5 gr
 - Agua destilada _____ 100 mL

- Auramina O al 0.1%
 - Permanganato de potasio _____ 0.5 gr
 - Agua destilada _____ 100 mL

- Alcohol ácido 0.5%
 - Ácido clorhídrico HCL _____ 0.5 mL
 - Etanol 70% _____ 100 mL

3) COLORACIÓN DE GROCOTT:

- Ácido Peryódico al 1%
 - Ácido Peryódico _____ 1 gr
 - Agua destilada _____ 100 mL

- Metanamina al 3%
 - Metanamina _____ 3 gr
 - Agua destilada _____ 100 mL

- Nitrato de plata al 10%
 - Nitrato de plata _____ 10 gr
 - Agua destilada _____ 100 mL

- Borax al 5%
 - Borax _____ 5 gr
 - Agua destilada _____ 100 mL

- Cloruro de Oro al 1%

Solución Matriz al 1% ____ ampolla de 1 mL en 99 mL de agua destilada. Para romper la ampolla de cloruro de oro, primero serruche superficialmente usando un marcador con punta diamante, luego coloque la ampolla en una botella grande que tenga un tapón de vidrio. Añada la mitad del agua (aproximadamente 45 mL),

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

asegure bien el tapón, y agite vigorosamente. Tan pronto la ampolla se rompa dentro de la botella, añada los otros 54 mL de agua destilada. Filtre.

- Al 0.1% _____ 10 mL de solución matriz de Cloruro de Oro al 1% y 90 ml de agua destilada.
- Al 0.2% _____ 20 mL de solución matriz de Cloruro de Oro al 1% y 80 ml de agua destilada.
- Tiosulfato de Sodio al 5%
 - Tiosulfato de Sodio _____ 5 gr
 - Agua destilada _____ 100 mL
- Light Green al 0.4%

Solución Matriz ____ 0.4 gr de light Green. SF amarillento en 100 mL de agua destilada.

Solución diaria _____ 10 mL de la solución matriz de light verde en 50 mL de agua destilada

❖ SOLUCIÓN DE TRABAJO GROCOTT: Vf=26mL

En un tubo cónico limpio agregar las siguientes soluciones:

- Metanamina al 3% _____ 12.5 mL
- Nitrato de plata al 10% _____ 0.5 mL

Retirar 0.5 mL y descartar, agregar las siguientes soluciones:

- Agua destilada _____ 12.5 mL
- Bórax al 5% _____ 1 mL

4) COLORACIÓN GRAM:

- Cristal Violeta 1%
 - Al 1% _____ 1 gr de cristal violeta (de genciana) en 100 mL de agua destilada.
- Lugol
 - Solución de Lugol _____ 1 gr de yodo, 2 gr de yoduro de potasio en 100 mL de agua destilada.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

- Alcohol acetona
 - Etanol y acetona _____ volumen / volumen
- Safranina al 1%
 - Safranina O _____ 1 gr
 - Agua destilada _____ 100 mL

5) COLORACIÓN DE WARTHIN STARRY:

- Agua acidulada
 - Ácido cítrico acuoso al 1%
 - ✓ Ácido cítrico _____ 1gr
 - ✓ Agua destilada _____ 100 mL
 - En 1000 mL de agua destilada añadir suficiente ácido cítrico acuoso al 1% para llevar el agua a un pH de 4.0

NOTA: Preparar previamente todas las soluciones de la técnica con **agua acidulada** y usar frascos cónicos nuevos.

- Nitrato de plata 1 %
 - Nitrato de plata _____ 1 gr
 - Agua acidulada _____ 100 mL
- Gelatina al 5%
 - Gelatina _____ 5 gr
 - Agua acidulada _____ 100 mL
- Hidroquinona 0.15%
 - Hidroquinona _____ 0.15 gr
 - Agua acidulada _____ 100 mL
- Nitrato de plata 2 %
 - Nitrato de plata _____ 2 gr
 - Agua acidulada _____ 100 mL

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS**❖ SOLUCIÓN DIARIA REVELADORA WARTHIN STARRY (Vf=50mL)**

- Nitrato de plata al 2% _____ 10 ml
- Hidroquinona al 0.15% _____ 15 mL
- Gelatina al 5% _____ 25 mL

6) COLORACIÓN GIEMSA:**❖ SOLUCIÓN MATRIZ GIEMSA (modificada)**

- Eosina Azul de Metileno _____ 0.12 gr
- Metanol _____ 100 mL

Agitar la solución matriz durante una hora a temperatura ambiente. Filtrar y almacenar. No usar la solución hasta el día siguiente.

❖ SOLUCIÓN DE TRABAJO GIEMSA

- Preparar solución acética (*): 1L de agua destilada + 2 gotas de ácido acético glacial.
- Mezclar solución matriz de Giemsa 1 : 1 Solución acética (*)

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS**Anexo N°8:****Montaje de Láminas**

1. Realizar la deshidratación con alcoholes de menor a mayor concentración:
2. Un alcohol corriente de 96°C y un alcohol absoluto 99.6°C por 30 segundos cada uno.
3. Realizar el aclaramiento de las muestras con Xilol o sustituto de Xilol.
4. Colocar las laminillas cubre objeto en la mesa y agregar una gota de solución de montaje (Entellan o Neoclear).
5. Tomar una lámina con la muestra hacia bajo y presionar lentamente sobre la laminilla y centrarla.
6. Limpiar con una tela el exceso de solución de montaje.
7. Etiquetar las láminas según el código correspondiente.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

Anexo N° 9: Registro de Entrega de Láminas a Microscopia

[illegible]



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud
del Niño-San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA MICROORGANISMOS

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Jinsong Z. Histochemistry. 1era Edición. Germany: De Gruyter; 2017.
2. Ricardo M, Raquel G. Fundamentos teóricos y prácticos de la Histoquímica. 1era Edición. España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 2008
3. Richard H, Gustav F. Histochemistry: An explanatory outline of histochemistry and biophysical staining. 2nd. ed. Germany: Butterwoths; 1982.