
	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	Versión V02-2021

MANUAL DE COLORACIONES




Elaboró (Oct-2021)	Revisó (Oct -2021)	Aprobó (Oct -2021)
Bacterióloga	Área de Calidad	Gerente
Dra. Diana Yarley Arias	Ing.Ana Elisabeth cely	Dr.Elver Fabian Nope

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
		Versión
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	V02-2021

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	3
1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
2. ALCANCE DEL MANUAL	4
4. MARCO LEGAL	5
5. GLOSARIO DE TÉRMINOS	5
6. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES OPERATIVAS.....	6
6.1 PREPARACIÓN DE UN FROTIS:.....	6
6.2 COLORACIONES	7
6.2.1 COLORACION DE WRIGTH:	7
6.3 COLORACION DE GRAM:	8
6.4 COLORACION DE ZIEHL NEELSEN:	12
8. ACTIVIDADES DE CONTINGENCIA.....	15
9. RECOMENDACIONES IMPORTANTES	15
10. IDENTIFICACIÓN DEL RIESGO:	16
11. DOCUMENTOS DE REFERENCIA.....	16
12. ANEXOS	17
13. FORMATOS Y REGISTROS	17
14. PRESTACION DE SERVICIOS DE SALUD CON ENFOQUE DIFERENCIA	21
15. BIOGRAFIA	
16. CONTROL CAMBIOS	
<i>Ilustración 1 COLORACION DE WRIGTH:.....</i>	<i>7</i>
<i>Ilustración 2 Pasos de la coloracion de Gram.....</i>	<i>11</i>
<i>Ilustración 3 Morfologias distinguibles en la tinion de gram</i>	<i>12</i>
<i>Ilustración 4 Coloracion de Zielh Neelsen</i>	<i>13</i>
<i>Ilustración 5 Implementos de bioseguridad</i>	<i>14</i>

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	Versión
		V02-2021

Introducción

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. (2)

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 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

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
		Versión
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	V02-2021

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.

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.

1. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar las técnicas utilizadas para el procedimiento en las coloraciones que se realizan en el Laboratorio Clínico de la ESE Hospital Ismael Silva.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Socializar la información necesaria para él la coloración de láminas, con todo el personal del laboratorio clínico de ESE Hospital Ismael Silva.


Descripción y actualización de procedimientos técnicos de las diferentes coloraciones que se realizan en de la E.S.E HOSPITAL SILVA Y SUS SEDES INTEGRADAS; AGUA BONITA Y SUBIA.

.

2. ALCANCE DEL MANUAL

El presente documento va dirigido al todo el personal de bacteriología y auxiliar de laboratorio, que pertenezca al laboratorio clínico de la ESE Hospital Ismael Silva, como instrumento guía y de consulta en el área de pruebas especiales.

3. CARGO LÍDER Y RESPONSABLES DEL CUMPLIMIENTO DEL MANUAL

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
		Versión
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	V02-2021

Coordinador/a de laboratorio, Bacteriólogos y auxiliar de laboratorio de la ESE Hospital Ismael Silva y toda persona que esté involucrada directa o indirectamente con la toma, recepción, condiciones de almacenamiento de las muestras para coloraciones, por tanto, es responsabilidad de todo el personal del laboratorio dar cumplimiento a todo lo establecido en este manual.


4. MARCO LEGAL

- 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."*

5. GLOSARIO DE TÉRMINOS

ACIDOS 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.

CELULA: 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.

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
		Versión
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	V02-2021

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.

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


TINCION O COLORACION: 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. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES OPERATIVAS

6.1 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.

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	Versión
		V02-2021

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.

6.2 COLORACIONES

6.2.1 COLORACION DE WRIGTH:

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.

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.

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.

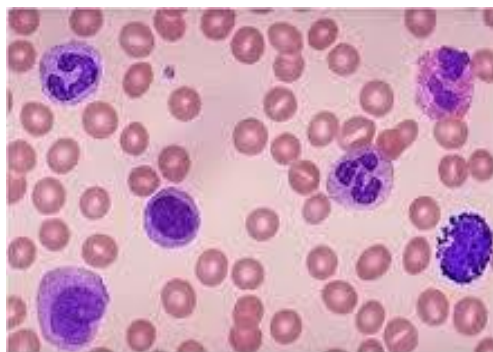



Ilustración 1 COLORACION DE WRIGTH:

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

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
		Versión
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	V02-2021

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).

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.

6.2.2 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 ISMAEL SILVA 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.

6.3 COLORACION 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

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	Versión
		V02-2021

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 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.

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
		Versión
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	V02-2021


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.

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	Versión
		V02-2021

TINCION DE GRAM

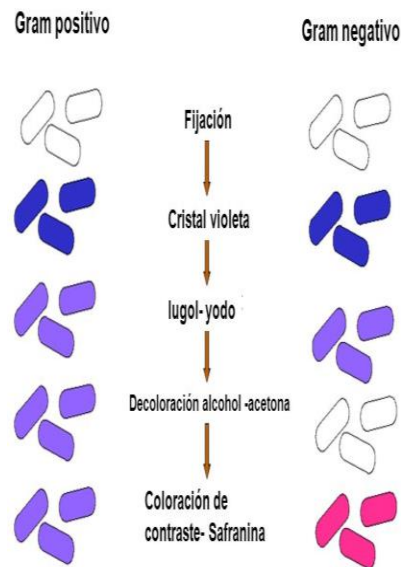


Ilustración 2 Pasos de la coloracion de Gram

Fuente: <https://pipetealo.wordpress.com/2016/12/06/tincion-de-gram/>

6.3.1 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.

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO	Versión
	SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	V02-2021

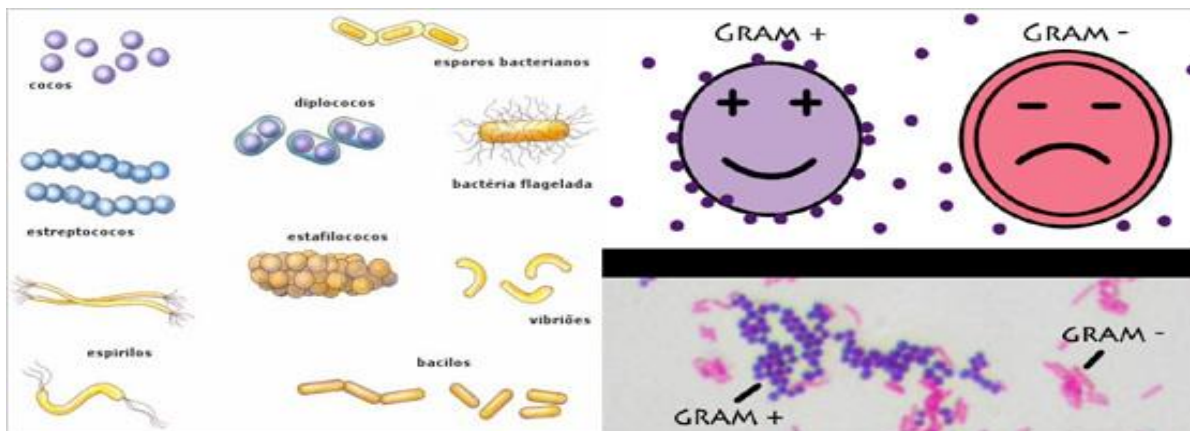


Ilustración 3 Morfologías distinguibles en la tinción de gram

Fuente: <http://biologiamedica.blogspot.com/2010/09/bacterias-gram-positivas-y-gram.html>

La coloración de Gram es responsabilidad del auxiliar de laboratorio clínico en la ESE HOSPITAL ISMAEL SILVA quien realizará la tinción de acuerdo a este manual, y quien tendrá supervisión del bacteriólogo a cargo de la sección de microscopía; 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.

1.1 COLORACION 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 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

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	Versión
		V02-2021

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.

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

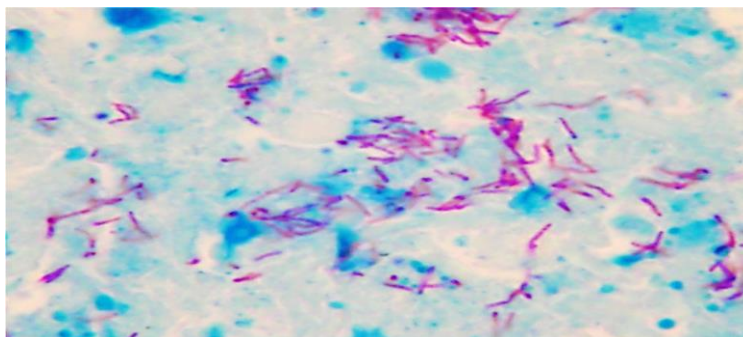



Ilustración 4 Coloración de Zielh Neelsen

Fuente: <https://fiestadelosmicroorganismos.wordpress.com/2016/12/15/practica-10-tincion-de-ziehl-neelsen/>

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	Versión V02-2021

DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES PARA EL DISEÑO, ELABORACIÓN, MODIFICACIÓN DE UN PROCESO

El extendido de la muestra es a cargo de la Bacterióloga de Laboratorio Clínico en la **ESE HOSPITAL ISMAEL SILVA**, la **coloración** de Ziehl Neelsen es responsabilidad de la Auxiliar de Laboratorio clínico en la **ESE HOSPITAL ISMAEL SILVA** quien realizara la tinción de acuerdo a este manual.

6.4.2 CONDICIONES ESPECIALES PARA TINCION DE NEELSEN

Además, para esta tinción el responsable debe utilizar los bioseguridad, como lo son:

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




LA
ZIEHL

profesional
implementos de

Ilustración 5 Implementos de bioseguridad

<http://karyynieto.blogspot.com/2016/09/medidas-de-bioseguridad.html>

7. DESCRIPCION DE ACTIVIDADES.

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
		Versión
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	V02-2021


RESPONSABLE	No	ACTIVIDAD	OBSERVACIÓN
Auxiliar de Laboratorio / bacteriólogas de procesamiento	1	Revisar que las pruebas solicitadas de FFV cuenten con consentimiento informado Registrar en el libro diario de baciloscopias los Bk recibidos Recibir las láminas extendidas previamente por las bacteriólogas de procesamiento para la realización de tinciones o coloraciones. Preparar el área de trabajo, implementos e insumos necesarios.	Formato Consentimiento para Fortis Vaginal y Cultivos Formato Registro de Baciloscopias.
Auxiliar de Laboratorio / bacteriólogas de procesamiento	2	Filtrar colorantes a utilizar Realizar procedimiento de coloraciones	Formato Control De Coloraciones y Filtración de Colorantes.
Auxiliar de Laboratorio.	3	Entregar a las bacteriólogas las láminas coloreadas y secas listas para su análisis	Formato Control De Coloraciones y Filtración de Colorantes

8. ACTIVIDADES DE CONTINGENCIA

- Fallas en red eléctrica. En este caso debe ponerse en conocimiento del coordinador de laboratorio para que el caso sea escalado a la subgerencia administrativa quien gestionará la solución de dicha contingencia.
- Fallas en la red de internet: En este caso debe ponerse en conocimiento del coordinador de laboratorio para que el caso sea escalado al área de sistemas quienes gestionaran la solución de dicha contingencia.
- Fallas en equipos de laboratorio: En este caso debe ponerse en conocimiento del coordinador de laboratorio para que el caso sea escalado a la casa comercial que suministra el comodato quienes gestionarán la solución de dicha contingencia
- Insuficiencia de insumos y reactivos En este caso debe ponerse en conocimiento del coordinador de laboratorio para que el caso sea escalado a la subgerencia científica quien gestionará la solución de dicha contingencia.

9. 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.

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLOROCIONES	ADT-M-05
		Versión
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	V02-2021

10. IDENTIFICACIÓN DEL RIESGO:

La tabla de identificación de riesgo, es la calificación de cada uno de los riesgos evidenciados que impacten negativamente el objetivo planteado, se tienen en cuenta criterios tales como probabilidad, frecuencia e impacto, los cuales identifican el valor final de cada uno de los riesgos, a fin de identificar las potenciales fallas del sistema, y mitigar el riesgo en su máxima expresión, por medio de una acción preventiva.

IDENTIFICACIÓN DE RIESGO					
RIESGO	PR	FR	IM	VALOR	ACCIÓN PREVENTIVA
Caída de la red eléctrica en la ESE.	3	1	5	15	La red de soporte (planta eléctrica) de la ESE debe funcionar inmediatamente, de no ser así, las láminas se almacenan listas para su posterior tinción y análisis
Ausencia o demora de transporte de muestras provenientes de puestos de salud asociados a la ESE	3	3	3	27	Las muestras tomadas, refrigeradas o puestas en baño serológico para conservar temperatura 37°C para su posterior envío, según la naturaleza de la muestra
Calamidad de personal de procesamiento, ausencia de personal, o necesidad de personal por catástrofes o emergencias.	1	1	5	5	El personal está disponible y capacitado para realizar actividades de procesamiento en el caso de necesitarse apoyo en la ESE.
SIGLAS					
PR: Probabilidad		FR: Frecuencia		IM: Impacto	
CRITERIO DE CALIFICACION					
Bajo= 1		Medio= 3		Alto= 5	
VALOR					
El resultado se obtiene de multiplicar			PR*FR*IM		

11. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

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".

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
		Versión
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	V02-2021

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"*.


12.ANEXOS

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"*

1

13. FORMATOS Y REGISTROS

- Formato Consentimiento para Fortis Vaginal y Cultivos
- Formato Registro de Baciloscopias.
- Formato Control De Coloraciones y Filtración de Colorantes.

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLOROCIONES	ADT-M-05
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	Versión
		V02-2021

14. PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE SALUD CON ENFOQUE DIFERENCIAL

Brindar una atención integral a cada uno de los usuarios, su familia y la comunidad que demanda el servicio del Hospital Ismael Silva de Sylvania E.S.E es un propósito institucional; por lo cual la comunicación efectiva y la caracterización adecuada de la población que se beneficia con la prestación de nuestros servicios es la base para la planeación de una atención específica que permita satisfacer las necesidades del usuario, su familia y la comunidad. Cuando se habla de una atención con enfoque diferencial se resalta que cada uno de los usuarios, familias y comunidad en general presenta unas características ya sean individuales, familiares o comunitarias, características que se debe tener en cuenta en el momento de generar la prestación del servicio.

Cuando se habla de enfoque diferencial es el reconocimiento de esas características particulares en razón de su edad, género, orientación sexual, grupo étnico y situación de discapacidad, deben recibir un tratamiento especial en materia de ayuda humanitaria, atención, asistencia y reparación integral.

Bajo este contexto la ESE estableció como población diferencial los siguientes grupos:

- Población de Adulto Mayor con patologías Crónicas
- Población Gestantes
- Población con discapacidad
- Población menos de 5 años
- Población LGTBI
- Población étnica.
- Población Afrodescendiente
- Población Privada de la Libertad
- Población Víctima del conflicto Armado

Con el fin de velar por el cumplimiento de la política institucional de enfoque diferencial La Institución Promueve los siguientes compromisos:

MI COMPROMISO COMO COLBORADOR DE LA DE E.S.E HOSPITAL ISMAEL SILVA DE SILVANIA ES:

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLOROCIONES	ADT-M-05
		Versión
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	V02-2021

Velar por la Eliminación de actos de discriminación, diferencias innecesarias, injustas y evitables en detrimento del estado de la salud, autoestima y supervivencia de nuestros usuarios.

POR GÉNERO Y ORIENTACION SEXUAL: La equidad de género en salud significa, Asegurar que las mujeres, los hombres y las personas LGTBI, tengan las mismas oportunidades para gozar de buena salud de acuerdo con sus necesidades y condiciones de vida sin señalamientos de ninguna clase.

POR ETNIA: La población indígena, Afro descendiente, Población ROM (Gitanos), deben tener igualdad de derechos para acceder a una atención con Trato Digno y actitud amable.

POR CICLO VITAL: El adulto mayor, los niños y niñas, la población infantil a cargo del ICBF u otras instituciones y la población mayor en centros de protección. Debemos estar dispuestos cuanto esté a nuestro alcance para favorecer la satisfacción de sus necesidades, sin sumar obstáculos adicionales a los que la sociedad ha creado.

POR CONDICION DE VIDA: Cuando se está e periodo gestacional o el curso de transición o identificación de identidad de género, a su mismo respetar las creencias y costumbres de cada individuo

POR SITUACIÓN DE DISCAPACIDAD: Asegurar la atención preferencial de nuestros usuarios con algún tipo de situación limitante en nuestras IPS, evitando que su condición (Física, Mental o Sensorial) afecte su potencial desarrollo de cuantas habilidades y destrezas pueda lograr.

POSICIÓN SOCIAL DESVENTAJOSA: Población en condiciones de desplazamiento forzado, menores desvinculados del conflicto armado, personas incluidas en el programa de protección a testigos, población desmovilizada. Significa crear los medios que garanticen la seguridad física, emocional, sexual, social, legal de las víctimas y apoyen los esfuerzos por retomar el control de sus vidas y avanzar en los procesos de curación, justicia y reparación.

Para todos estos grupos poblacionales debemos conocer, entender e informar a los pacientes los beneficios con que cuentan acorde a la normatividad vigente para su salud y bienestar

1. CARACTERIZACION DE LA ATENCION CON ENFOQUE INTEGRAL Y DIFERENCIAL

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLOROCIONES	ADT-M-05
		Versión
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	V02-2021

La atención diferencial e integral debe tener unas características especiales tales como:

1. Siempre brinde un trato respetuoso y diferencial: Dar un trato digno y respetuoso que tenga en cuenta las necesidades de cada persona permite crear una sociedad más inclusiva y brindar un servicio oportuno y adecuado a la población priorizada por la institución


2. Sea un conocedor: Infórmese y prepárese para ayudar a crear una atención en salud más participativa, conociendo, al menos de manera general, las barreras que enfrentan los usuarios y población especial en cada uno de los ciclo de atención.

3. Pregunte antes de ayudar: Identifique cuales son las habilidades y características especiales de cada población y persona antes de ayudar con el fin de identificar si la persona quiera recibir ayuda y así identificar cual es la mejor forma de ayudarle y respetar su autonomía e independencia.

4. No subestimar o exaltar sin razón: Una condición especial o característica especial de cada individuo no define la condición humana del mismo. Por lo tanto, estas personas no son más o menos que otras personas. Subestimar sus capacidades o exaltar sus logros “a pesar de su discapacidad”, acentúa las barreras existentes para su participación y goce efectivo de derechos.

5. Tenga en cuenta el lenguaje: Se debe activar la comunicación verbal y no verbal en cada uno de los momentos de verdad que se tiene con el usuario y su familia por eso las expresiones deben ser respetuosas e incluyentes.

- **Escuche:** Escuche siempre a las personas y permita que expresen sus necesidades. De ser necesario, deles el tiempo que requieran para hacerlo. Su conocimiento, escucha y empatía son las herramientas que le permitirán ayudarles a encontrar soluciones a sus necesidades
- **Utilice herramientas:** Recuerde que no existe una sola forma de comunicarse. Complemente su atención a las personas con discapacidad con el uso de herramientas de comunicación alternas como lápiz, papel, imágenes o ejemplos que le permitan comprender mejor su requerimiento.
- **Disposición:** Escuche, explique con calma y de forma sencilla, y evite comportamientos que puedan hacer sentir incómoda o maltratada a la persona con discapacidad
- **Rectifique:** Verifique que la información suministrada al ciudadano con discapacidad ha sido efectivamente comprendida. Para esto solicite retroalimentación y, si es necesario, repita la información en un lenguaje claro y sencillo, manteniendo la exactitud y veracidad de ésta.

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLORACIONES	ADT-M-05
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	Versión V02-2021

15. BIBLIOGRAFÍA.


de Laboratorio en la práctica corriente. Laboratorio Lutecia de Colombia S.A. 10ª Edición. 2010.

Patrick R. Murray, Phd; Ken S. Rosenthal, Phd y Michael A. Pfaller, Phd. Microbiología Médica. 6ª Edición. Barcelona, España. Gel Consultores Editorial S.A. 2012.

Coloraciones Exámenes Microbiológicas INT-R04.6022-005. Versión 3 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología Luis Esaú López-Jácome,* Melissa Hernández-Durán,* Claudia Adriana Colín-Castro,* Silvestre Ortega-Peña,* Guillermo Cerón-González,* Rafael Franco-Cendejas*

GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE TUBERCULOSIS DIRECCIÓN DE REDES EN SALUD PÚBLICA SUBDIRECCIÓN LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA GRUPO DE MICOBACTERIAS 2017.

	HOSPITAL ISMAEL SILVA E.S.E Y SU RED DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Código
	MANUAL DE TOMA DE COLOROCIONES	ADT-M-05
	PROCESO APOYO DIAGNOSTICO Y TERAPEUTICO SUBPROCESO LABORATORIO CLINICO	Versión
		V02-2021

16. CONTROL DE CAMBIOS

CONTROL DE CAMBIOS							
Fecha del cambio	Versión actual	Justificación del Cambio	Parte del Documento donde se requiere el Cambio	Cambio que se le realiza al documento	Versión Nueva	Nombre y Cargo de quien elaboro el Cambio:	Nombre y Cargo de quien Aprobó el Cambio:
01 Octubre de 2021	V01-2020	Es necesario incluir el enfoque diferencial al contenido del documento solicitado por la R. 3100 de 2019	Capítulo de Enfoque Diferencial	Especifico las actividades y recomendaciones que se deben seguir para la atención de los pacientes con enfoque diferencial	V02-2021	Ana Elizabeth Cely – Líder de Calidad	Dr. Elver Fabián Nope - Gerente