
ANEXO III

Técnicas de coloración

En este anexo describiremos las técnicas siguientes:

- (I) Técnica de Papanicolaou
- (II) Técnica de Harris-Shorr
- (III) Técnica de Harris Shorr modificada

y en la sección (IV) se detalla la preparación de los colorantes.

(I) Técnica de Papanicolaou

Colorante Tricrómico

- 1) Paso de tinción nuclear: Hematoxilina de Harris
Filtrado con papel de filtro
Alcohol rectificado
- 2) Orange G: Coloración citoplasmática (tiñe de naranja las células acidófilas)
Filtrado con papel de filtro
Alcohol rectificado
- 3) EA 65: Contraste citoplasmático (tiñe de verde las células basófilas)
Filtrado con papel de filtro.

Ventajas

- Coloración de buena calidad
- Preferida por los citólogos para hacer diagnóstico

Desventajas

- Alto gasto de alcoholes
- Colorantes de alto costo
- Insume más tiempo que otras técnicas.

Consumo

Cada 1000 láminas coloreadas insume:

- 500cc de hematoxilina de Harris
- 500cc de Orange G
- 500cc de EA 65

- ❑ 5 litros de alcohol rectificado (alcohol 95%)
- ❑ 1 pliego de papel de filtro
- ❑ 2 litros de alcohol isopropílico (en lugar del alcohol 100%)
- ❑ 2 litros de Xylol
- ❑ 25cc de bálsamo de Canadá (se puede sustituir por 500 gr de goma DAMAR + 1 litro de Xylol)
- ❑ 1 litro de agua destilada

Procedimiento:

- ❑ Extracción del spray fijador:
- ❑ 20 minutos en alcohol rectificado
- ❑ Lavado con agua corriente y agua destilada 2 minutos
- ❑ Hematoxilina de Harris 5 minutos
- ❑ Diferenciado en agua corriente 15 minutos(para virado de hematoxilina)
- ❑ Alcohol 95° 2 minutos
- ❑ Orange G 3 minutos
- ❑ Pasaje por alcohol 95° 2 minutos
- ❑ Pasaje al siguiente contraste EA 3 minutos
- ❑ Lavado en alcohol rectificado 2 minutos
- ❑ Pasaje en alcohol isopropílico 1 – 2 minutos
- ❑ Pasaje en alcohol isopropílico 2 – 2 minutos
- ❑ Xylol 1 – 2 minutos
- ❑ Xylol 2 – 2 minutos
- ❑ Bálsamo para montar: 60 láminas por hora

Duración: 17 horas para 1000 láminas

Verificación

Luego de aplicar cada colorante el técnico verifica el estado de los colorantes observando al microscopio una lámina de muestra.

Observará:

- 1) si los núcleos están bien teñidos luego de la hematoxilina
- 2) que el colorante no esté precipitado (gránulos), descarta presencia de hongos.
- 3) después del Orange se controla tinción del citoplasma orangófilo
- 4) después del EA se controla el citoplasma de las células basófilas.

(II) Técnica Harris-Shorr

Técnica tricrómica en 2 pasos.

- 1) Tinción nuclear con Hematoxilina de Harris.
- 2) Lavado con alcohol rectificado
- 3) Colorante de Shorr

(Hematoxilina de Harris: 5 gramos de polvo por litro de solución)

Se debe filtrar antes y después de usar.

Ventajas:

- Ahorro en alcohol al usar un solo colorante citoplasmático (contraste)
- Igual calidad para la observación y diagnóstico por parte del citólogo.
- Menos tiempo de duración del procedimiento.

Desventajas:

- Ninguna

Consumo

Cada 1000 láminas insume:

- 500cc de hematoxilina de Harris
- 500cc de Shorr
- 4 litros de alcohol rectificado
- $\frac{3}{4}$ pliego de papel de filtro
- 2 litros de alcohol isopropílico
- 2 litros de Xylol
- 25cc de Balsamo de Canadá (o 500 gr de goma DAMAR)
- 1 litro de Xylol
- 1 litro de agua destilada.

Procedimiento:

- ❑ Extracción de spray con alcohol 20 minutos
- ❑ Lavado en agua destilada 2 minutos
- ❑ Hematoxilina de Harris 5 minutos
- ❑ Agua corriente 15 minutos (para virado de hematoxilina)
- ❑ Alcohol 95° 2 minutos
- ❑ Colorante Schorr 4 minutos
- ❑ Alcohol 95 2 minutos
- ❑ Isopropílico 1 – 2 minutos
- ❑ Isopropílico 2 – 2 minutos
- ❑ Xylol 1 – dos minutos –se vuelca se recupera
- ❑ Xylol 2 – dos minutos
- ❑ Montaje: bálsamo y cubre 60 láminas por hora
- ❑ Duración: 17 horas para 1000 láminas

(III) Técnica Harris- Shorr modificada o variante Shorr

Procedimiento:

- Extracción de spray
- Lavado en agua destilada 2 minutos
- Hematoxilina de Harris 2 a 4 minutos
- Virado agua corriente 10 minutos (para virado de hematoxilina)
- Lavado agua destilada
- Colorante Schorr 1 minuto
- Virado agua destilada 5 minutos
- Sol madre de mordiente 3 minutos
- Lavado agua destilada
- Verde luz 1 minuto
- Alcohol 95 2 minutos
- Alcohol 100
- Xilol
- Bálsamo
- Montaje

(*) El detalle de preparación de dichos colorantes se indica en la sección siguiente.

(IV) Preparación de Colorantes

Cuidados generales:

Se recomienda no exponer los colorantes al sol o a la luz y guardarlos en la oscuridad. Se recomienda guardarlos filtrados.

1) Solución Madre de Hematoxilina de Harris

Componentes	Cantidad
Hematoxilina en polvo	5gr
Alcohol 100%	100ml
Alumbre de potasio o amonio	20gr
Oxido amarillo de mercurio	0.5gr
Ácido acético glacial	1ml
Agua destilada	1ltr

- a. Se disuelven 5 grs. de polvo de Hematoxilina en 100ml de alcohol absoluto calentando para disolver la Htx.
- b. Preparar la solución B disolviendo 20 grs. de alumbre de potasio en 1 litro de agua destilada calentando para disolver el alumbre.
- c. Dejar reposar unas horas hasta que se enfríen las 2 soluciones.
- d. Mezclar las dos soluciones.
- e. Agregar 0,5 grs. de Oxido amarillo de mercurio.
- f. Pasar a una botella color oscuro(para preservar el colorante) filtrando con filtro de papel.
- g. Dejar reposar la preparación durante 24 horas en lugar oscuro.

Rendimiento: Rinde 1 ltr

2) Colorante de Shorr (para la técnica Harris Shor -III)

Componentes	Cantidad
Alcohol etílico 50%	100ml
Biebrich escarlata	0.5gr
Orange gold	0.25gr
Fast green FCF	0.075gr
Ácido Fosfotungstico	0.5gr
Ácido fosfomolibdico	0.5gr
Ácido acético glacial	1ml

Rendimiento: Rinde 100cm³

- a. Mezclar 100cc de alcohol 50% co todos los demas componentes (Biebrich, orange,fast green etc), mezclando y calentando.
- b. Luego de que esta bien mezclado se pasa una botella oscura filtrando.

3) Colorante de Shorr (para la técnica Harris Shor modificado-I)

Componentes:	Cantidad
Fucsina ácida	3gr
Ácido acético-orange gold	6gr
Punceau de xilidine	6gr
Acido acético glacial	1ml
Agua destilada	1ltr

- a. Disolver en un litro de agua destilada: 3grs de fucsina ácida , 6gr de orange, 6 gr de Punceau,
- b. Luego de que esta bien mezclado se agrega 1 ml de ácido acético glacial.

Rendimiento: Rinde 1litro

4) Solución Madre de Verde luz

Componentes	Cantidad
--------------------	-----------------

Verde Luz	10gr
Acido acetico glacial	1ml
Agua Destilada	1 ltr

- a. Mezclar 1ml de ácido acético glacial y 1lt de agua destilada
- b. Agregar 10 grs. de Verde Luz.
- c. Guardar la solución resultante en frasco con vidrio oscuro.

Rendimiento: Rinde 1litro

5) Solución Madre de Mordiente

Componentes	Cantidad
Acido Fosfotungstico	12.5gr
Acido fosfomolibdico	12.5
Acido acetico glacial	1ml
Agua Destilada	0.5 ltr

- a. Se disuelve 12.5 grs de ácido fosfotungstico y 12.5 gr de acidofosfomolibdico en 500 ml de agua destilada.
- b. Agregar 1ml de ácido acético glacial.
- c. Guardar la solución resultante en frasco con vidrio oscuro.

Rendimiento: Rinde ½ litro

6) Solución Orange Gold

Componentes	Cantidad
Orange G	0.5gr
Alcohol 95%	1ltr
Acido Fosfotungstico	0.015gr

- ❑ Disolver el Orange, 0.5 en 1l de alcohol 95% calentando y mezclado
- ❑ Luego agregar el ácido fosfotungstico 0.015grs
- ❑ Rinde 1litro

7) **Solución EA50**

Componentes	Cantidad
Bismarck Brown	0.5 gr
Light green	2.25gr
Eosin Y	2.25gr
Acido Fosfotungstico	2gr
Carbonato de Litio	5mgr
Alcohol 95%	1 ltr

- Disolver todos los componentes en 1litro de alcohol 95, mezclando y calentando (en un calentador agitador)

Rendimiento: Rinde 1litro.