

		1	Nº de ref.
Gram Stain Kit			
Gram Crystal Violet	Para la tinción diferencial de bacterias.	1 x 250 mL	212539
Gram Iodine (estabilizado)		1 x 250 mL	
Gram Decolorizer		1 x 250 mL	
Gram Safranin		1 x 250 mL	
Gram Stain Kit		1	212524
Gram Crystal Violet	Para la tinción diferencial de bacterias.	1 x 250 mL	
Gram Iodine (no estabilizado)		1 x 250 mL	
Gram Decolorizer		1 x 250 mL	
Gram Safranin		1 x 250 mL	
Gram Crystal Violet	Para tinción de microorganismos por medio del método diferencial de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212525 212526
Gram Iodine (estabilizado)	Para tinción de microorganismos por medio del método diferencial de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212542 212543
Gram Iodine (no estabilizado)	Para tinción de microorganismos por medio del método diferencial de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212529 212530
Gram Decolorizer	Para tinción de microorganismos por medio del método diferencial de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212527 212528
Gram Safranin	Para tinción de microorganismos por medio del método diferencial de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212531 212532
Gram Basic Fuchsin	Para tinción de microorganismos por medio del método diferencial de Gram.	4 x 250 mL 1 x 3,8 L	212544 212545

USO PREVISTO

Los Gram Stain Kits y reactivos para tinción de Gram se utilizan para realizar tinciones de microorganismos de cultivos o muestras mediante el método diferencial de Gram.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La tinción de Gram fue creada en 1884 por Christian Gram con la intención de distinguir las células bacterianas del tejido infectado. Aunque Gram observó lo que ahora se denomina la "reacción de Gram", no reconoció el valor taxonómico de su técnica.

La tinción de Gram ahora se utiliza para diferenciar las bacterias intactas y morfológicamente similares en dos grupos según el color de la célula después de la tinción. Además, se hacen evidentes la forma, el tamaño y los detalles estructurales de la célula. Dicha información preliminar proporciona indicios importantes en cuanto al tipo de organismo u organismos presentes y las técnicas posteriores necesarias para caracterizarlos.

Dado que el yodo inorgánico se oxida rápidamente y pierde su eficacia como mordiente¹, el Gram Stain Kit (Nº de ref. 212539) se distingue de la fórmula original de dicho procedimiento por ofrecer un complejo de yodo orgánico más estable, L-polivinilpirrolidona-yodo.

FUNDAMENTO DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento de tinción de Gram² consta de las siguientes etapas:

Realizar la tinción de un frotis preparado con cristal violeta.

Aplicar yodo como mordiente.

Decolorar el colorante primario con alcohol/acetona; y realizar una contracoloración con safranina o fucsina básica

Un complejo de cristal violeta-yodo se forma en el protoplasto (no en la pared celular) de todos los organismos a los que se aplica la tinción con este procedimiento. Los organismos capaces de retener este complejo colorante después de la decoloración se clasifican como grampositivos, mientras los que pueden decolorarse y admiten contratinción se clasifican como gramnegativos.

Si se altera o se elimina la pared celular, el protoplasto de células grampositivas (además de las gramnegativas) pueden decolorarse y el atributo grampositivo se pierde. Por consiguiente, el mecanismo de tinción de Gram parece estar relacionado con la presencia de una pared celular intacta capaz de actuar como barrera a la decoloración del colorante primario.

Por lo general, la pared celular es permeable de una manera no selectiva. Teóricamente, durante el procedimiento de tinción de Gram, la pared celular de las células grampositivas se deshidrata por el alcohol en el descolorante y pierde permeabilidad, por lo que retiene el colorante primario. Sin embargo, la pared celular de las células gramnegativas tiene un contenido lipídico mayor, y se vuelve más permeable cuando se le trata con alcohol, lo que da como resultado la pérdida del colorante primario.

La base molecular para la tinción de Gram no se ha determinado todavía.

REACTIVOS

Fórmula aproximada* por litro

Gram Crystal Violet

COLORANTE PRIMARIO

Cristal violeta	3,0 g
Isopropanol	50,0 mL
Etanol/Metanol	50,0 mL
Agua destilada	900,0 mL

Gram Iodine

MORDIENTE

(Solución de trabajo preparada con diluyente para Gram y yodo para Gram 100X)

Cristales de yodo	3,3 g
Yoduro potásico	6,6 g
Agua destilada	1,0 L

Stabilized Gram Iodine

MORDIENTE

Complejo polivinilpirrolidona-yodo	100,0 g
Yoduro potásico	19,0 g
Agua destilada	1,0 L

Gram Decolorizer

DESCOLORANTE

Acetona	250,0 mL
Isopropanol	750,0 mL

Gram Safranin

CONTRACOLORANTE

Safranina O en polvo (colorante puro)	4,0 g
Etanol/Metanol	200,0 mL
Agua destilada	800,0 mL

Gram Basic Fuchsin

CONTRACOLORANTE

Fucsina básica	0,08 g
Fenol	2,6 g
Alcohol isopropílico	4,5 mL
Agua destilada	993,0 mL

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Advertencias y precauciones: Para uso diagnóstico *in vitro*.

Con el tiempo, puede generarse un ligero precipitado en Gram Basic Fuchsin. No se verá afectado el rendimiento del producto.

Gram Crystal Violet: Nocivo por inhalación y por ingestión. Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. Posibilidad de efectos irreversibles. Manténgase el recipiente bien cerrado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar. No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles. Úsense indumentaria y guantes de protección adecuados.

Gram Iodine 100X: Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel. Manténgase el recipiente bien cerrado. No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles. Evítese el contacto con los ojos y la piel. Úsense indumentaria protectora adecuada.

Stabilized Gram Iodine: Nocivo en contacto con la piel. Provoca quemaduras. Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. Manténgase el recipiente bien cerrado. No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles. Evítese el contacto con los ojos y la piel. Úsense indumentaria protectora adecuada.

Gram Decolorizer: Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. Manténgase el recipiente bien cerrado y en lugar bien ventilado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar. No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles. Evítese el contacto con los ojos y la piel.

Gram Safranin: Nocivo por inhalación y por ingestión. Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. Manténgase el recipiente bien cerrado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar. Úsense indumentaria y guantes de protección adecuados.

Gram Basic Fuchsin: Puede causar cáncer. Puede causar alteraciones genéticas hereditarias. Irrita los ojos. Manténgase el recipiente bien cerrado. No respirar el polvo. Evítese el contacto con los ojos y la piel. Úsense indumentaria protectora adecuada.

En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

Gram Iodine 100X: Quítese inmediatamente la ropa manchada o salpicada.

En caso de contacto con la piel, lávense inmediata y abundantemente con agua.

Si se produce inhalación, salir al aire libre. Si se detiene la respiración, administre la reanimación cardiopulmonar. Si la respiración es dificultosa, administrar oxígeno. Acúdase a un médico.

En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstrele la etiqueta o el envase.

Conservación: Al recibir el producto, se debe guardar entre 15 y 30 °C. La fecha de caducidad es aplicable a los frascos sin abrir, almacenados según indicaciones. No abrir hasta que vayan a utilizarse.

Utilizar la solución de trabajo de yodo para Gram tradicional dentro de los 3 meses de preparación, sin superar la fecha de caducidad de ningún componente.

Deterioro del producto: La solución de yodo para Gram no estabilizada reconstituida puede causar una variabilidad en la tinción de Gram, cuando no quede suficiente yodo en la solución. Proteger la solución de yodo de la exposición indebida al aire, la luz y el calor, para asegurar que la solución está suministrando la actividad de mordiente adecuada.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Aplicar la muestra de análisis a un portaobjetos de vidrio limpio de manera que se produzca un frotis delgado y uniforme. Emulsionar las colonias de un cultivo de 18 – 24 h en solución salina para obtener la densidad adecuada.

Dejar que el frotis se seque al aire.

Fijar el frotis al portaobjetos mediante una de las técnicas siguientes:

1. Fijar con calor pasando el portaobjetos por una pequeña llama entre 2 y 3 veces. Deje enfriar el portaobjeto a temperatura ambiente antes de realizar la tinción. **NOTA:** No sobrecalentar el portaobjetos; el calentamiento excesivo causará una tinción atípica.
2. Fijar el frotis con metanol en el portaobjetos cubriéndolo con metanol absoluto durante 1 – 2 minutos y aclarar con agua corriente antes de la tinción³. **NOTA:** Para una fijación adecuada, almacenar el metanol absoluto en un frasco con tapa roscada y opaca, y volver a llenar con solución de trabajo cada dos semanas.

PROCEDIMIENTO

Preparación del reactivo

Preparar la solución de trabajo de yodo para Gram tradicional agregando una ampolla completa de 2,5 mL de Gram Iodine 100X a 250 mL de Gram Diluent o un vial completo de 40 mL de Gram Iodine 100X a 3,8 L de Gram Diluent; mezclar a conciencia.

Materiales suministrados: Gram Crystal Violet, Gram Iodine o Stabilized Gram Iodine, Gram Decolorizer y Gram Safranin o Gram Basic Fuchsin.

Materiales necesarios pero no suministrados: Portaobjetos de microscopio, mechero Bunsen o metanol, asa bacteriológica, torundas, papel secante, microscopio con lente de inmersión en aceite y portaobjetos para Gram.

Procedimiento del análisis:

1. Cubrir el frotis fijado con tinción primaria (Gram Crystal Violet) y dejar actuar la tinción durante 1 minuto.
2. Retirar la tinción primaria lavando suavemente con agua corriente fría.
3. Cubrir el portaobjetos con mordiente (Gram Iodine o Stabilized Gram Iodine) y mantenerlo en el portaobjetos durante 1 minuto.
4. Retirar el mordiente lavando suavemente con agua corriente fría.
5. Descolorar (con Gram Decolorizer) hasta que el disolvente del portaobjetos se vaya completamente con el agua (3 – 60 seg.).
6. Lavar el portaobjetos suavemente en agua corriente fría.
7. Cubrir el portaobjetos con contracolorante (Gram Safranin o Gram Basic Fuchsin) y realizar la tinción durante 30 – 60 segundos.
8. Lavar el portaobjetos con agua corriente fría.
9. Secar con papel secante o toalla de papel o dejar secar al aire.
10. Examinar el frotis bajo una lente de inmersión en aceite.

Control de calidad del usuario

El control de calidad se debe llevar a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones pertinentes del CLSI (antes NCCLS) y la normativa de la CLIA para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

Realice los análisis de control con el **BBL Gram Slide** (N.º de ref. 231401) o cultivos de 18 – 24 h de microorganismos grampositivos o gramnegativos conocidos. Para ello se recomienda utilizar las siguientes cepas de prueba:

Microorganismo	ATCC	Resultados previstos
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	cocos grampositivos
<i>Escherichia coli</i>	25922	bastoncillos gramnegativos

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La tinción de Gram proporciona información de identificación primaria solamente, y no está diseñada para sustituir los estudios de cultivo de la muestra. Los resultados de tinción de Gram deben confirmarse con procedimientos adicionales tales como análisis directo de antígenos y cultivos de los medios.

Cualquier tratamiento anterior con antibióticos puede hacer que organismos grampositivos de una muestra aparezcan como gramnegativos.

Se aconseja el uso de cultivos de 18 – 24 h para obtener resultados óptimos, dado que las células recientes tienen una mayor afinidad que las células de más antigüedad para la mayoría de los colorantes. Esto se aplica en especial al caso de las bacterias formadoras de esporas, que son fuertemente grampositivas cuando se las examina en cultivos recientes, pero que luego se vuelven gram-variables o grampositivas.

La reacción de tinción de Gram se ve afectada por la alteración física de la pared celular bacteriana o protoplasto. Las paredes celulares de las bacterias grampositivas interponen una barrera que evita la absorción del complejo colorante desde el citoplasma. Las paredes celulares de las bacterias gramnegativas contienen lípidos solubles en disolventes orgánicos, que luego se liberan para decolorar el citoplasma. Por consiguiente, un microorganismo físicamente alterado por exceso de calor no reacciona a la tinción de Gram de la manera prevista.

“Para obtener resultados exactos, se debe cumplir cuidadosamente con el procedimiento y los criterios de interpretación. La exactitud depende en gran medida de la capacitación y la capacidad del especialista en microbiología”².

Los resultados de la tinción de Gram, incluida la morfología del organismo, pueden verse afectados por la antigüedad del aislado, las bacterias que contienen sistemas enzimáticos autolíticos, los cultivos transferidos de medios con antibióticos, además de muestras recogidas de pacientes que reciben tratamiento con antibióticos⁴. “El material de fondo y los artefactos también pueden interferir con la interpretación. La tinción grampositiva precipitada por lo general aparece con forma de cocos irregulares, o bien con forma de estrella similar al tejido reticulado de los hongos”⁴.

RESULTADOS PREVISTOS Y CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO¹⁻⁴

Reacción	Con Gram Safranin	Con Gram Basic Fuchsin
Grampositiva	Células de color violeta oscuro	Células de color violeta brillante a oscuro
Gramnegativa	Células de color rosa a rojo	Células de color rosa brillante a fucsia

REFERENCIAS: Ver “Referencias” en el texto en inglés.