



USO PREVISTO

Los reactivos para la coloración de GRAM se utilizan para realizar tinciones de microorganismos de cultivos o muestras mediante el método diferencial de GRAM.

PRINCIPIO

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. La coloración de GRAM ha constituido un elemento fundamental para la taxonomía e identificación. Las bacterias GRAM positivas que presentan una gruesa capa de peptidoglicano como estructura fundamental por sobre la membrana citoplasmática, y las GRAM negativas, que encima de ésta, presentan una delgada capa de peptidoglicano, a la que se superpone una capa de lipopolisacáridos-lipoproteína, denominada membrana externa. La presencia de esta membrana diferencia actualmente dos divisiones en sistemática bacteriana: las que no lo poseen, Firmicutes (GRAM +) y las que sí, Gracilicutes (GRAM-). Esta coloración permite la clasificación de las bacterias en GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS SEGÚN LA COMPOSICIÓN DE SU PARED CELULAR. Por esto el complejo de color formado con la pared de las bacterias gram positivas no puede ser removido con el agente decolorante que es el alcohol acetona. La célula permanece de color azul violeta, en cambio las bacterias gram negativas, al decolorarse con el alcohol acetona, se dejan colorear con la fucsina ó safranina, quedando de color rosado

CONTENIDOS

R 1 VIOLETA CRISTAL (VIOLETA GENCIANA) GRAM

–Listo para su uso

R 2 VIOLETA CRISTAL, Amonio Oxalato, Agua desmineralizada tipo II LUGOL SOLUCIÓN YODO/YODURO GRAM -Listo para su uso

Yodo metálico, Yoduro de potasio, Agua desmineralizada tipo II

R 3 ALCOHOL ACETONA DECOLORANTE GRAM

– Listo para su uso

Alcohol Etilico al 96%, Acetona

R 4 FUCSINA BÁSICA GRAM –Listo para su uso

Fucsina básica, Fenol, Alcohol etílico al 96%

Alternativa

SAFRANINA GRAM –Listo para su uso

Safranina, Alcohol etílico al 96%

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos están listos para su uso.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- Las soluciones deben almacenarse entre 15°C y 30°C y protegidos de la luz. Después de abierto el contenido almacenado entre 15°C y 30°C y protegidos de la luz es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Temperaturas inferiores a 15°C puede precipitar colorantes de las soluciones colorantes.

- Los frascos deben mantenerse siempre bien cerrados.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- La solución R1 VIOLETA CRISTAL (VIOLETA GENCIANA) GRAM y la solución R4 FUCSINA BÁSICA GRAM o SAFRANINA GRAM son irritantes en contacto con piel, ojos y mucosas.
- La solución R3 ALCOHOL ACETONA DECOLORANTE GRAM y la solución R4 FUCSINA BÁSICA GRAM o SAFRANINA GRAM son inflamables, por lo tanto se deben tomar los cuidados requeridos para el manejo de productos inflamables en el laboratorio.
- Observe la simbología en los rótulos de las soluciones.
- Las soluciones usadas y las caducadas deben eliminarse como desechos especiales, debiendo cumplir las regulaciones locales para el desecho de compuestos peligrosos.

MATERIALES ADICIONALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- Microscopio
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Cubeta de tinción
- Frasco lavador
- Agua
- Mechero
- Cronometro y/o timer

MUESTRAS

Líquidos corporales, exudados, material de colonias líquido o sólido.

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 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.



Toda muestra biológica debe ser considerada como potencialmente infecciosa.

PROCEDIMIENTO

- Cubrir la preparación (Placa) fijada con VIOLETA CRISTAL (VIOLETA GENCIANA) GRAM por un (1) minuto.
- Lavar suavemente con agua corriente fría. Eliminar el exceso de agua.
- Cubrir la preparación (Placa) con LUGOL SOLUCIÓN YODO/YODURO GRAM por un (1) minuto.
- Lavar suavemente con agua corriente fría. Eliminar el exceso de agua.
- Decolorar la placa con ALCOHOL ACETONA DECOLORANTE GRAM Por 15 - 30 segundos hasta que la placa decolore totalmente.
- Lavar suavemente con agua corriente fría. Eliminar el exceso de agua.
- Cubrir la preparación (Placa) con FUCSINA BÁSICA GRAM o SAFRANINA GRAM por un (1) minuto.
- Lavar suavemente con agua corriente fría. Eliminar el exceso de agua.
- Examinar al microscopio con lente de inmersión de 100X.

NOTAS SOBRE EL EMPLEO

La técnica descrita anteriormente puede modificarse de acuerdo con las preferencias del operador para lograr mayor o menor intensidad de coloración, lo cual implica variaciones en los tiempos de tinción, decoloración y lavado. Se ha encontrado que el mal uso del ALCOHOL ACETONA DECOLORANTE GRAM en la fase de decoloración puede llegar a decolorar los gérmenes GRAM POSITIVOS.

RESULTADOS PREVISTOS

Microorganismos GRAM Positivos	Azul-Violeta
Microorganismos GRAM Negativos	Rosa-Rojo

CONTROL DE CALIDAD

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. Los controles pueden realizarse con bacterias GRAM Positivas (Staphylococcus aureus) y bacterias GRAM Negativas (Escherichia coli). Para ello deben utilizarse cultivos procedentes de medios de cultivo incubados durante 18-24 horas.

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.
- La reacción de tinción de GRAM se ve afectada por la alteración física de la pared celular bacteriana o protoplasto. Por consiguiente, un microorganismo físicamente alterado por exceso de calor no reacciona a la tinción de GRAM de la manera prevista. Es importante controlar la fijación por el calor (dos-tres pasos de un segundo por llama suave); un exceso del mismo puede dar coloraciones erróneas.
- Agua altamente clorada puede debilitar la coloración de contraste.

BIBLIOGRAFÍA

- Gurr, E., Synthetic dyes in Biology, Medicine and Chemistry. Academic Press, London, New York. (1971).
- Splengler, M.S., Rodeheaver, G.T., Richter, L., Edgerton, Edlich, R.F.. The Gram stain – The most important diagnostic test of infection. J. Am. College Emergency Physicians 7, 434-438. (1978).
- Clark, George, Stains and staining (Microscopy), 4th edition, Williams & Wilkins, (1981).

Índice de Símbolos					
	Producto para diagnóstico in-vitro		Referencia o Código		Pruebas por Kit
	Para usar consulte las instrucciones		Precaución Consultar las instrucciones		Fabricante
	Número de Lote		Fecha de Caducidad		Fecha de Fabricación
	Límite de Temperatura		Riesgo Biológico		

