

TINCIÓN GRAM

PRINCIPIO

La tinción de Gram fue creada en 1884 por Christian Gram y es un elemento fundamental en la identificación microbiológica. Aunque Gram observó lo que ahora se denomina la "reacción de Gram", no reconoció el valor taxonómico de su técnica. La tinción de Gram permite diferenciar las bacterias en dos grupos según el color de la célula después de la tinción. Es un sistema de dos tinciones simples sucesivas, separadas por una fase de decoloración. Permite diferenciar las bacterias que retienen el primer color, que aparecen azules (Gram positivas) de las que no lo retienen y se tiñen de rosa (Gram negativas). La diferencia se debe a la pared celular. 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. Esta pared celular debe estar intacta para una correcta tinción. Durante la tinción, la pared celular de las células grampositivas se deshidrata por el alcohol del decolorante y pierde permeabilidad, por lo que retiene el complejo formado por el colorante primario (violeta cristal) y el yodo (mordiente). Por el contrario, las células gramnegativas que tienen una pared con mayor contenido lipídico se vuelven más permeables en la decoloración con alcohol y pierden el colorante primario, quedando teñidas posteriormente con el colorante de contraste (safranina o fucsina).

USO PREVISTO

Familia de productos sanitarios para diagnóstico in vitro destinado a la diferenciación de bacterias gram positivas y gram negativas en bacteriología utilizando el método diferencial de Gram.

Son colorantes cualitativos que dan información sobre el estado fisiológico o patológico de la muestra de tejido cuando la tinción obtenida es interpretada por profesional cualificado. Para obtener un diagnóstico, los resultados se han de evaluar en el contexto de los antecedentes médicos, el estado físico y el resto de datos clínicos y de laboratorio obtenidos.

Para uso profesional de laboratorio.

REACTIVOS Y COMPOSICIÓN

Violeta Cristal	1 x 500mL	Ref. 99 52 02
(Colorante primario)	1 x 1000 mL	Ref. 99 45 00
	1 x 5000 mL	Ref. 99 98 02
	6 x 250 mL	Ref. 99 99 13
	1 x 1000 ml (STAINER)	Ref. 99 53 00

Composición	
Colorante Violeta cristal, C.I. 42555	0,40 %
Etanol	15 %
Fenol	< 1 %

Violeta de Genciana Fenicada.	1 x 500 mL	Ref. 99 79 28
(Colorante primario)	1 x 1000 mL	Ref. 99 79 41
	1 x 5000 mL	Ref. 99 65 57

Composición	
Colorante Violeta de genciana, C.I. 42555	0,45 %
Etanol	3 %
Fenol	1 %

Decolorante Gram	1 x 500 mL	Ref. 99 04 95
	1 x 1000 mL	Ref. 99 04 89
	1 x 5000 mL	Ref. 99 11 10
	6 x 250 mL	Ref. 99 76 70
	1 x 1000 ml (STAINER)	Ref. 99 54 89

Composición	
Etanol	70 %
Acetona	30 %

Safranina	1 x 500 mL	Ref. 99 99 21
(Colorante de contraste)	1 x 1000 mL	Ref. 99 87 15
	1 x 5000 mL	Ref. 99 65 01
	6 x 250 mL	Ref. 99 98 04
	1 x 1000 ml (STAINER)	Ref. 99 57 15

Composición	
Safranina, C.I. 50240	0,4 %
Etanol	20 %

Fucsina Gram	1 x 1000 mL	Ref. 99 72 17
(Colorante de contraste)	1 x 1000 ml (STAINER)	Ref. 99 56 17

Composición	
Fucsina básica, C.I. 42510	0,02 %

Disolución de Iodo Lugol	1 x 500 mL	Ref. 99 30 85
(mordiente)	1 x 1000 mL	Ref. 99 88 42

Composición	
Iodo	0,4 %
Ioduro potásico	0,8 %

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Los reactivos almacenados a 10-35°C y protegidos de la luz, son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Los envases deben mantenerse siempre bien cerrados.

El paso del tiempo y temperaturas inferiores a 10°C, pueden provocar la aparición de un ligero precipitado en algún reactivo, que no afecta a la funcionalidad del producto. Se aconseja atemperar el reactivo a 15-30°C, agitar y filtrar el colorante antes de su uso.

La estabilidad en uso debe ser determinada por cada usuario según su criterio

MATERIAL NO SUMINISTRADO

Material de uso general de laboratorio.
Portaobjetos y cubreobjetos, mechero Bunsen, asa de siembra, cubetas de tinción, papel secante, microscopio con lente de inmersión.

Las tinciones de Gram se pueden usar con un método de tinción manual o con equipos automáticos de tinción (consultar teñidores QCA disponibles en la web). Seguir las instrucciones de uso de los equipos automáticos suministradas por el fabricante.

PRECAUCIONES

Los reactivos se deben manipular con precaución. Las indicaciones de seguridad se encuentran en la etiqueta de los productos. Se aconseja consultar la ficha de datos de seguridad antes de la manipulación del reactivo. La eliminación de residuos debe hacerse según la normativa local vigente.

Cualquier incidente grave relacionado con el producto deberá comunicarse a QCA y a la autoridad competente del estado en el que esté establecido el usuario.

MUESTRA

Extensiones bacterianas procedentes de diversos fluidos corporales como exudados, fluidos pulmonares, esputos, sedimentos de orina, cultivos bacterianos, etc.

La manipulación de las muestras debe realizarse de acuerdo con los protocolos establecidos en cada laboratorio para la preparación de muestras, siguiendo el estado del arte vigente. Extender la muestra con un asa en un portaobjetos directamente o mezclando con solución salina para conseguir un frotis uniforme y delgado. Secar al aire y fijar con calor pasando el portaobjetos por una pequeña llama entre 2 y 3 veces. Dejar enfriar el portaobjeto antes de realizar la tinción.

Manipular las muestras con precaución por su capacidad potencialmente infecciosa.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda seguir las prácticas de control de calidad marcadas por los organismos internacionales y realizar tinciones de forma periódica con preparaciones de control de calidad con microorganismos ATCC para este fin.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE TRABAJO:

El colorante está listo para su uso, para tinción manual y para su uso en el QCA STAINER.

PROCEDIMIENTO

1. Cubrir la extensión fijada con el colorante primario, Violeta Cristal o Violeta de Genciana Fenicada. Dejar actuar durante 1 minuto.
2. Lavar con agua corriente. Eliminar el exceso de agua.
3. Cubrir la extensión con el mordiente, el Iodo Lugol. Dejar actuar 1 minuto.
4. Lavar con agua corriente. Eliminar el exceso de agua.
5. Decolorar la extensión con Decolorante Gram hasta que ya no se produzca eliminación de colorante de la preparación. Aproximadamente 15-30 segundos, dependiendo del grosor de la extensión.
6. Lavar con agua. Eliminar el exceso de agua.
7. Teñir la extensión con el colorante de contraste, Safranina o Fucsina Gram, durante 1 minuto.
8. Lavar con agua corriente y secar al aire.
9. Examinar al microscopio con objetivo de inmersión.

Para el QCA STAINER, las distintas metodías se encuentran en el software del sistema.

Cada usuario debe validar este procedimiento en su laboratorio para ajustarlo a su metodología estándar, aplicando las diversas variantes de este procedimiento, tanto manual como automático, que le permita optimizar los resultados. Se debe tener en cuenta que la intensidad de la coloración es proporcional al tiempo de tinción.

RESULTADOS

Bacterias Gram-positivas: violeta oscuro

Bacterias Gram-negativas: rosa-rojo

NOTAS

El resultado de la tinción es orientativo y debe confirmarse con pruebas adicionales adecuadas.

Se recomienda utilizar cultivos de 18-24 h como máximo y extensiones recientes ya que cultivos y preparaciones viejas pueden dar resultados erróneos.

Es importante controlar la fijación por el calor porque un exceso del mismo puede dar coloraciones erróneas ya que puede alterar la pared celular.

El tratamiento antibiótico previo de la muestra puede producir alteraciones en la tinción, dando resultado gramnegativo en bacterias grampositivas.

Si se usa agua corriente para el lavado, tener presente que aguas intensamente cloradas pueden debilitar la coloración de contraste.

BIBLIOGRAFÍA

- Clark, G. (1981) "Staining Procedures", 4th ed., Williams & Wilkins.
- Bartholomew, J. M., Mittwer, T. (1952), Bacteriol. Rev., 16, 1-29.
- CLSI Guidelines and Standards, CLSI, Wayne, P.A
- Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).
- Moyes R. B. , J. Reynolds, and D. P. Breakwell (2009) Differential Staining of Bacteria: Gram Stain', Current Protocols in Microbiology, vol. 15.

3, PG III UN: 1993



H226

P210,P233,P280,P303+P361+P353,P370+P378,P403+P235,P501

ES - VIOLETA GENCIANA FENICADA / CRISTAL

Atención

Peligro: Líquidos y vapores inflamables.

Precaución: Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. Mantener el recipiente herméticamente cerrado. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ducharse. En caso de incendio: Utilizar los medios descritos en punto 5 de la Ficha de Datos de Seguridad. Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco. Eliminar el contenido/el recipiente según el punto 13 de la Ficha de Datos de Seguridad.

3, PG II UN: 1993



H225,H319,H336

P210,P233,P261,P280,P370+P378,P403+P233,P403+P235

ES - DECOLORANTE GRAM

Peligro

Peligro: Líquido y vapores muy inflamables. Provoca irritación ocular grave. Puede provocar somnolencia o vértigo.

Precaución: Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. Mantener el recipiente herméticamente cerrado. Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. Llevar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara/los oídos/... En caso de incendio: Utilizar los medios descritos en punto 5 de la Ficha de Datos de Seguridad. Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente cerrado herméticamente. Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco.

3, PG III UN: 1993



H226

P210,P233,P280,P303+P361+P353,P370+P378,P403+P235,P501

ES - SAFRANINA

Atención

Peligro: Líquidos y vapores inflamables.

Precaución: Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. Mantener el recipiente herméticamente cerrado. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ducharse. En caso de incendio: Utilizar los medios descritos en punto 5 de la Ficha de Datos de Seguridad. Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco. Eliminar el contenido/el recipiente según el punto 13 de la Ficha de Datos de Seguridad.

PT - FUCSINA GRAM

ES - SOLUCION DE IODO (LUGOL)