

# COLORACIÓN DE GRAM

## Modificación de Hücker



biopack.com.ar

REF Nº de catálogo: 2000151000

IVD Reactivo de Diagnóstico para Uso in Vitro

### Uso previsto:

La Coloración de Gram es un método de tinción diferencial empleado para la caracterización fenotípica de las bacterias.

Aplica para el diagnóstico en muestras clínicas (sangre, orina, fluidos corporales y/o preparaciones histológicas).

Esta tinción por el método de Gram es la más apropiada para conseguir información de valor y debe hacerse en todos los casos en que esté indicada la tinción. Se emplea también como método habitual para el examen de cultivo a fin de determinar su pureza y con fines de identificación. La tinción de Gram debe usarse para teñir cualquier muestra remitida para el cultivo de bacterias u hongos. Los gérmenes se clasifican como Gram positivos o Gram negativos dependiendo de su capacidad para retener el colorante violeta cristal tras su exposición a una solución de acetona alcohol. La reactividad de los microorganismos depende de las características de la pared celular. Las bacterias se tiñen positivas o negativamente con excepción de Legionella y Mycobacteria que no se tiñen en lo absoluto. Los hongos son invariablemente Gram positivos. La tinción de Gram ayuda a determinar la presencia o ausencia de infección y los posibles microorganismos productores de la misma en caso de que exista.

Además los datos que proporciona la tinción pueden emplearse para interpretar los resultados del cultivo. Los microorganismos anaeróbicos y gérmenes resistentes, o los que han sido expuestos a antibióticos pueden observarse mediante la tinción de Gram y sin embargo no crecen en los cultivos.

En los casos de una sospecha de tuberculosis son necesarios procesos especiales de cultivo y tinción. Dado que el Mycobacterium tuberculosis y otros organismos resistentes al ácido no se coloran con la tinción de Gram, es necesario emplear uno de los diversos procedimientos para organismos ácido resistentes. Las micobacterias se tiñen con el método de Ziehl Neelsen. El Mycobacterium tuberculosis ácido alcohol resistente, de extremos redondeados, que se tiñen de forma irregular. Su aspecto es a veces algo incursado, tiene una longitud de 1 a 4 micrones, y a un ancho de 0.3 a 0.6 micrones. Su ácido-resistencia demostrable por la técnica de tinción de Ziehl Neelsen, se debe ante todo a los componentes lipídicos de su pared celular.

### Principio de acción o aplicación del producto:

La Coloración de Gram es el procedimiento de tinción más utilizado en bacteriología. Mediante una serie de pasos de tinción y decoloración, las bacterias presentes en la muestra se diferencian según la composición de su pared celular.

Las células Gram positivas tienen una gruesa capa de peptidoglicano y se tiñen de azul a púrpura. Las células Gram negativas tienen una delgada capa de peptidoglicano y se tiñen de tono rosado a rojo.

La tinción de Gram consta de cuatro pasos básicos:

1. Aplicación del colorante primario (violeta cristal)
2. Adición de un mordiente (Lugol de Gram),
3. Decoloración rápida con alcohol, acetona o una mezcla de alcohol y acetona,
4. Contratinción con safranina.

El método de Gram (Hans Christian Gram, 1884) utilizaba violeta de genciana como colorante principal en la tinción.

El presente Kit de Coloración presenta la modificación introducida por Hücker, donde ese colorante es reemplazado por Violeta Cristal y utiliza una solución alcohólica de colorante de contraste Safranina.

El examen de las muestras recibidas en el laboratorio microbiológico comprende dos tipos de procedimiento generales: el examen directo de una extensión teñida o sin teñir, y el cultivo en los medios adecuados. Al remitirse muestras para exámenes bacteriológicos, unas preparaciones y tinciones bien realizadas ofrecen una orientación excelente acerca de los medios que inocular y que ulteriores exámenes deben hacerse, siendo este un paso importante para el médico en el tratamiento del paciente.

Para los estudios bacteriológicos hay varios métodos de tinción siendo especialmente útiles el método de Gram con algunas de sus modificaciones y, en el caso de una sospecha clínica de infección por Mycobacteria, el método de Ziehl Neelsen. Los productos COLORANTES BACTERIOLÓGICOS DE BIOPACK ® (COLORACIÓN DE GRAM [MODIFICACIÓN DE HÜCKER] Y COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN) son colorantes de utilidad en el laboratorio microbiológico clínico. Estas tinciones funcionalmente cuentan con 4 etapas: tinción primaria, mordiente, decoloración y tinción secundaria, esta última también llamada coloración de contraste o contratinción.

1) La tinción primaria es generalmente un colorante básico con carga positiva. Los colorantes primarios comunes incluyen carbol fucsina, violeta cristal, azul de metileno y safranina. Estos colorantes primarios van a marcar no solamente el microorganismo blanco, sino también muchos microorganismos no blancos y material de fondo. Los colorantes son compuestos orgánicos naturales o artificiales compuestos por tres componentes básicos: una anilla de benceno o aromático, un cromóforo, y grupos auxocrómicos. La mayoría de los colorantes biológicos son derivados del alquitrán y su estructura fundamental es el anillo de benceno. Los grupos atómicos específicos conocidos como cromóforos se asocian con el color. Estos radicales químicos absorben la luz de diferentes longitudes de onda ya que actúan como prismas químicos. El anillo de benceno con los radicales cromóforos se considera el cromógeno y es coloreado, pero en sí mismo no es un colorante ya que no puede unirse a los microorganismos o tejidos. Los grupos auxocrómicos proveen las propiedades de combinación del colorante formando uniones salinas electrostáticas con radicales ionizables sobre las proteínas, glicoproteínas y lipoproteínas de componentes de los tejidos o de las membranas de los gérmenes. Este proceso puede ocurrir directamente o a través de la acción quelante del mordiente.

Los colorantes son anfotéricos, es decir, pueden actuar como ácido o como base de acuerdo a si la mayor proporción del colorante es aniónica o catiónica.

Los colorantes básicos marcan estructuras que son ácidas, y los colorantes ácidos reaccionan con sustancias básicas.

2) Un mordiente es un proceso químico o físico que fija el colorante primario al microorganismo blanco. Los mordientes comunes incluyen complejos iodados como se usa en la coloración de Gram, y calor o fenol usados en la marcación rápida ácida.

3) Un decolorante es una sustancia química que extrae o elimina cualquier tinción inespecífica o de unión inestable con el microorganismo blanco. Luego del paso de la decoloración, los microorganismos blanco son el color de la tinción primaria, y los organismos no blancos y el fondo deben estar desprovistos de color. Los decolorantes comunes incluyen acetona o alcohol para la coloración de Gram, y una mezcla de ácido y alcohol para la marcación ácida rápida.

4) La marcación secundaria o contramarcación es un método para proveer color a los microorganismos no blanco. En general, la contramarcación se haya dentro de una parte diferente del espectro visible de marcación primaria. Algunas contramarcaciones son aditivas a las marcaciones primarias. Por ejemplo, la contramarcación roja de la tinción Gram es aditiva a la marcación primaria azul para producir un microorganismo blanco de color púrpura. En otros casos la contramarcación no marca en absoluto al microorganismo blanco. Por ejemplo, la contramarcación azul de la marcación ácida rápida no penetra en el microbio blanco (Mycobacteria) para afectar su color rojo. Por lo tanto, el objetivo es rojo y el fondo es azul.

### Reactivos y presentación:

Lugol solución ..... envases x 100 mL y 1000 mL  
Decolorante solución ..... envases x 100 mL y 1000 mL  
Safranina solución ..... envases x 100 mL y 1000 mL  
Violeta Cristal solución ..... envases x 100 mL y 1000 mL

### Condiciones adecuadas de almacenamiento:

Almacenar a temperatura ambiente entre 15°C y 30°C. Proteger de la luz.

Conservar bajo llave en lugar fresco y bien aireado lejos del alcance de los niños. Mantener el recipiente bien cerrado y alejado de fuentes de ignición.

### Precauciones, cuidados especiales y riesgos:

Tóxicos si se inhala o ingiere. Inflamable. Evitar contacto con la piel. Si ocurriera la inhalación, ingesta o contacto con la piel en forma accidental, consultar al médico. No fumar durante su uso. Solamente para uso diagnóstico in vitro.

### Orientaciones sobre los cuidados con la muestra biológica:

Muestra de sangre. Es importante que la muestra de sangre sea recogida en forma aseptica, limpiando la piel con alcohol al 80-95% y luego aplicando una solución de ioduro al 2% en forma concéntrica en el sitio de venopuntura. Como la antisepsia nunca

se da en forma instantánea, el desinfectante debe permanecer en contacto con la piel por lo menos durante 1 minuto. Se sugiere extraer 20 ml de sangre en adultos y 1 a 5 ml en niños. En condiciones óptimas, la sangre debe ser inoculada directamente en el medio de cultivo al lado del paciente mediante una jeringa o aguja. Cuando esto no fuera posible, la sangre debe ser transportada al laboratorio en tubo estéril conteniendo polianetol sulfonato sódico (SPS) y luego inoculada en el medio de cultivo.

Cateteres intravasculares: los catéteres intravasculares son una fuente importante de bacteriemia y fungemia. Por lo tanto, la identificación microbiana de catéteres es importante para establecer la relación con infección con gérmenes Gram positivos y Gram negativos. Se debe remitir al laboratorio 5 cm de la porción distal del catéter. La muestra debe ser transportada al laboratorio en forma inmediata para prevenir la desecación.

Heridas, tejidos, abscesos, muestra de drenaje. El análisis microbiológico de estas muestras muchas veces es la única información acerca de la etiología de un proceso infeccioso. Toda vez que se pueda es preferible tomar muestra del tejido o del líquido de la lesión a realizar hisopados. Cuando sólo puedan obtenerse muestras de hisopados. Éstos deben abarcar todas las superficies sospechosas.

Orina. Como la orina es un excelente medio de crecimiento para los microorganismos, las muestras de orina deben ser cultivadas dentro de la hora de recolección de la muestra a menos que sean refrigeradas. En paciente de sexo femenino y en hombres con incontinencia es preferible utilizar el chorro medio de orina como muestra. Ante la sospecha de infección por gérmenes anaeróbicos es preferible utilizar la punción suprapubica ya que la uretra es colonizada normalmente por gérmenes anaeróbicos que podrían interferir con el resultado.

El laboratorio que recibe la muestra debe anotar al momento de recepción para identificar el tiempo de tránsito de la muestra. Las muestras que han estado demasiado tiempo en tránsito pueden no ser útiles para el análisis microbiológico. Las muestras deben ser transportadas en recipientes adecuados. El personal que toma o transporta la muestra debe estar informado acerca del riesgo que contraer una enfermedad infecciosa que es inherente a esta actividad.

### Consideraciones previas al uso:

- Para muestras de sangre, realizar el extendido y fijar con calor previo a comenzar con el procedimiento de tinción.
- Para muestras citológicas por punción aguja fina, secreciones o exudados, proceder a realizar los extendidos, fijar y luego comenzar con procedimiento de tinción.
- Para muestras de tejido fijado e incluido en parafina, desparafinar e hidratar los cortes histológicos; luego comenzar con el procedimiento de tinción.
- Tenga en cuenta que la calidad del extendido celular o el corte histológico (concentración celular demasiado alta o demasiado baja) afectará los resultados de la tinción de Gram.
- Todas las soluciones del presentes kit se encuentran en concentraciones listas para usar. Cualquier agregado a su composición original puede alterar su función y/o estabilidad.

### Procedimiento de uso:

Paso	Reactivos / Aplicación	Temp.	Tiempo	Observaciones
1.	Violeta Cristal / Cubrir la muestra	RT	1 min.	Ajustar tiempo de ser necesario
2.	Agua corriente / Lavado rápido	RT	2 seg.	n/a
3.	Lugol de Gram / Cubrir muestra	RT	1 min.	n/a
4.	Agua corriente / Lavado rápido	RT	2 seg.	n/a
5.	Decolorante / Gota a gota por arrastre	RT	5 seg.	n/a
6.	Agua corriente / Lavado rápido	RT	2 seg.	Cortar acción decolorante y eliminar restos ácidos
7.	Safranina / cubrir la muestra	RT	1 min.	n/a
8.	Agua corriente / Lavado	RT	n/a	n/a
9.	Dejar escurrir las muestras en posición vertical	RT	n/a	n/a
10.	Observar al microscopio de Campo claro con Aceite inmersión	RT	n/a	n/a

### Referencias:

- RT: Temperatura ambiente
- n/a: No aplica
- Min: Minutos
- Seg: Segundos

**Resultados:**

- Bacterias Gram Negativas ..... rosa / rojo
- Bacterias Gram Positivas ..... azul / púrpura.

**Limitaciones del proceso de medición:**

La técnica de Gram es un primer paso orientativo para identificación de bacterias y hongos en líquidos biológicos. Le permite al laboratorista tener una primera aproximación al germe causal de una infección lo cual, a su vez, permite al médico iniciar el tratamiento con prontitud a la espera de otros resultados de laboratorio. Luego de la realización de la prueba de Gram, el cultivo de la muestra proveerá información adicional para la identificación del germe y el antibiograma informará la sensibilidad antibiótica del mismo.

**Solamente para uso profesional:**

La aplicación de este tipo de reactivos debe ser realizada por personal especializado. El usuario deberá cumplir las directivas locales sobre seguridad en el trabajo y aseguramiento de la calidad.

**Protección contra infecciones:**

El usuario debe considerar el uso de equipamiento de protección personal eficaz contra infecciones de acuerdo con las directivas de trabajo en laboratorio.

**Indicaciones para la eliminación de residuos:**

El envase debe ser eliminado de acuerdo con las directivas válidas de eliminación de residuos.

Las soluciones usadas y las soluciones caducas deben eliminarse como desecho peligroso, debiéndose cumplir las directivas locales de eliminación de residuos.

**Clasificación de sustancias peligrosas:**

Tener en cuenta la clasificación de sustancias peligrosas en la etiqueta del producto y las indicaciones de la ficha de datos de seguridad.

Ficha de seguridad del producto en [www.biopack.com.ar](http://www.biopack.com.ar)

Todos nuestros productos cuentan con su correspondiente ficha técnica y de seguridad, disponibles en forma on line: [www.biopack.com.ar](http://www.biopack.com.ar)

**Referencias Bibliográficas:**

1. American Chemical Society Specification, 8va. Ed., 1993, pág. 103-105,319-321,370-373.
2. Todd Sandford. Diagnóstico clínico por el laboratorio. I. Davidsom, J.B. Henry. 6ta. Ed., Salvat, pág. 139-162.
3. Arthur W.Ham. Tratado de Histología, 7ma. Ed., Interamericana, pág. 235-269.
4. Jay H. Stein, Ed. Medicina Interna. Tomo II. Salvat Editores, 5ta. Reimpresión, Barcelona, 1986, 2064p.
5. Albert Balows, Ed. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 5ta. Ed., Washington, 1991, 1364p.

**Indicación al consumidor:**

El producto está garantizado por el fabricante hasta su fecha de vencimiento si se lo transporta y almacena en las condiciones prescriptas. Ante cualquier consulta, el fabricante puede ser contactado personalmente, por email o por teléfono o ingresando en [www.biopack.com.ar](http://www.biopack.com.ar) solapa de contacto.

Consultar instrucciones de uso en [www.biopack.com.ar](http://www.biopack.com.ar)

 REF Número de catálogo

 IVD Reactivo de Uso in Vitro

 Elaborador

 Consultar instrucciones de uso

 Contiene suficientes para <n> pruebas

 Elaborado por:  
SISTEMAS ANALITICOS S.A.

**Sistemas  
Analíticos** Ruta Nacional 9 km 105,5.  
(2800) Zárate, Provincia de Buenos Aires, República Argentina.

Director técnico: Marcelo L. Palacios, Farmacéutico M.N. 12407.

Reactivos de Diagnóstico de Uso in Vitro.  
Producto autorizado por ANMAT, certificado N° 3613.  
Uso profesional exclusivo