

## GRAM BRITANIA

REF	B1446082	REF	B1446281	REF	B1446421
REF	B1446562	REF	B1446321	REF	B1446362
REF	B1445862	REF	B1445221	REF	B1445262
IVD					

### → USO

Reactivos utilizados para realizar la coloración de Gram a los microorganismos a partir de diversas muestras y/o a partir de cultivos microbianos.

### FUNDAMENTO

La coloración de Gram ha constituido desde los albores de la microbiología un elemento fundamental para la taxonomía e identificación de los microorganismos.

Es uno de los ensayos básicos en bacteriología y constituye una ayuda invaluable en la identificación microbiana.

La observación microscópica no basta para hacer diagnóstico bacteriológico pero es de fundamental importancia como orientación del camino a seguir para una correcta identificación bacteriana así como para dar una presunción rápida de los agentes patógenos observados en el material en estudio.

El comportamiento de los microorganismos como patógenos y la sensibilidad antibacteriana difieren sustancialmente; de ahí que la realización rápida de una coloración de Gram reviste enorme importancia en Bacteriología Clínica.

El investigador danés Christian Gram en 1884 demostró que ciertos microorganismos coloreados con violeta de genciana y mordentados con solución de lugol, cuando eran sometidos a la acción de una mezcla alcohol-acetona se decoloraban mientras que otros retenían el color violeta.

Esto ha constituido uno de los grandes pilares de la bacteriología ya que permitió la división de los gérmenes en Gram negativos y Gram positivos respectivamente, grupos que presentan características bien definidas que orientan no solo el diagnóstico etiológico sino también a la actitud terapéutica.

Luego del descubrimiento casual realizado por Christian Gram, pasaron muchos años durante los cuales se efectuaron las más variadas especulaciones sobre el mecanismo de esta coloración. Resultaba indudable, sin embargo, su practicidad a los fines de la identificación.

El conocimiento de las estructuras de las membranas bacterianas, tanto en el aspecto físico como en su composición molecular que fueron logrados a partir de la década del sesenta, demostró que la coloración de Gram distingue dos grupos de bacterias totalmente diferentes.

La diferencia de la reacción entre bacterias Gram positivas y Gram negativas es atribuida a diferencias químicas y físicas de su pared celular.

Las bacterias Gram positivas presentan una gruesa capa de peptidoglicano como estructura fundamental por sobre la membrana citoplasmática mientras que las bacterias Gram negativas presentan por sobre la membrana citoplasmática una delgada capa de

peptidoglicano a la que se superpone una capa de lipopolisacáridos-lipoproteína denominada "membrana externa".

La presencia de esta "membrana externa" diferencia actualmente dos divisiones en sistemática bacteriana: las que no la poseen, Firmicutes (Gram positivas) y las que sí la poseen, Gracilicutes (Gram negativas).

En la coloración de Gram, el violeta de genciana es captado en la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas y luego se forma un complejo con el lugol.

El decolorante actúa extrayendo los lípidos de la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram negativas lo que produce un aumento en la permeabilidad y se pierde el complejo formado entre el violeta de genciana y el lugol.

Al agregar la safranina, las bacterias Gram negativas toman el color de este contracolorante y se observan de color rosado.

A diferencia de estas, en las bacterias Gram positivas el agregado del decolorante produce disminución de la permeabilidad e incrementa la retención del complejo del violeta de genciana-iodo. El resultado es que se observan de color violeta por la retención del mismo.

**Laboratorios Britania** ha logrado un equipo colorante estable para Gram que permite obtener excelentes tinciones en 2 minutos gracias a la purificación de los colorantes y a la elección de las modificaciones que en nuestra experiencia dan los mejores resultados.

### Productos Britania con los que se utiliza este manual de instrucciones:

#### Gram Britania equipo:

##### Contenido y composición

- Violeta de Genciana para Gram: 1 Envase x 100 mL, listo para usar .
- Solución de violeta de genciana (cristal violeta) 0.2%, en mezcla de Etanol/Agua
- Lugol Concentrado para Gram: 1 ampolla x 10 mL. Para preparar 100 mL de solución. Solución concentrada 10X, constituida por yodo bisublimado en solución de hidróxido de sodio.
- Decolorante para Gram: 1 Envase x 100 mL, listo para usar. Solución constituida por mezcla de alcohol / acetona: 70,5 / 29,5.
- Safranina para Gram: 1 Envase por 100 mL, listo para usar. Solución de safranina 0.25%, en mezcla de Etanol/Agua.

##### Instrucciones:

Los colorantes violeta de genciana y safranina y el decolorante para Gram se encuentran listos para usar.

El lugol está concentrado 10X y debe ser diluido con agua purificada 1/10 previo al uso. Se pueden preparar 100 mL de solución y se recomienda envasar la solución preparada en frasco gotero de vidrio.

### Decolorante para Gram:

#### Contenido y composición

- Presentación: 1 envase x 100 mL.
- Presentación: 1 envase x 500 mL.
- Solución constituida por mezcla de alcohol / acetona: 70,5 / 29,5.

#### Instrucciones:

Decolorante listo para usar.

### Gram Britania Repuesto, soluciones concentradas:

#### Contenido y composición

- Violeta de Genciana Concentrado para Gram: 1 ampolla x 10 mL. Para preparar 100 mL de solución. Solución de violeta de genciana (cristal violeta) 2% en etanol. Solución concentrada 10 X.
- Lugol Concentrado para Gram: 1 ampolla x 10 mL. Para preparar 100 mL de solución. Solución concentrada 10X, constituida por yodo bisublimado en solución de hidróxido de sodio.
- Safranina Concentrada para Gram: 1 ampolla x 10 mL. Para preparar 100 mL de solución. Solución de safranina 2,5 % en etanol. Solución concentrada 10 X.

#### Instrucciones:

Las soluciones están concentradas 10X. Diluir con agua purificada 1/10 previo al uso.

Los colorantes concentrados Violeta y Safranina una vez diluidos pueden ser envasados en frascos gotero de plástico. El Lugol una vez que ha sido diluido se recomienda envasarlo en frasco gotero de vidrio.

### Violeta de Genciana concentrado para Gram:

#### Contenido y composición

- Presentación: 3 ampollas x 10 mL cada una .
- Presentación: 1 envase x 500 mL.

Solución de violeta de genciana (cristal violeta) 2% en etanol. Solución concentrada 10 X. Por cada ampolla x 10 mL se puede preparar 100 mL y por cada envase por 500 mL se puede preparar 5 litros de solución de violeta de genciana lista para usar.

#### Instrucciones:

Solución concentrada 10X. Diluir 1/10 con agua purificada previo al uso. La solución preparada puede ser envasada en frasco gotero de plástico. Seguir la técnica de coloración descrita más abajo.

### Lugol Concentrado para Gram:

#### Contenido y composición

- Presentación: 3 ampollas x 10 mL cada una.
- Presentación: 1 envase x 500 mL.

Solución concentrada 10X, constituida por yodo bisublimado en solución de hidróxido de sodio. Por cada ampolla x 10 mL se puede preparar 100 mL y por cada envase por 500 mL se puede preparar 5 litros de solución de lugol lista para usar.

#### Instrucciones:

Solución concentrada 10X. Diluir 1/10 con agua purificada previo al uso. Se recomienda envasar la solución preparada en frasco gotero de vidrio. Seguir la técnica de coloración descrita más abajo.

### Safranina concentrada para Gram:

#### Contenido y composición

- Presentación: 3 ampollas x 10 mL cada una
- Presentación: 1 envase x 500 mL

Solución de safranina 2,5 % en etanol. Solución concentrada 10 X. Por cada ampolla x 10 mL se puede preparar 100 mL y por cada envase por 500 mL se puede preparar 5 litros de solución de safranina lista para usar.

#### Instrucciones:

Solución concentrada 10X. Diluir 1/10 con agua purificada previo al uso. La solución preparada puede ser envasada en frasco gotero de plástico. Seguir la técnica de coloración descrita más abajo.

### CARACTERÍSTICAS DE LOS PRODUCTOS LISTOS PARA LA COLORACIÓN

- Violeta de genciana: solución color violeta.
- Lugol: solución color marrón.
- Decolorante: solución incolora.
- Safranina: solución rojiza.

### ALMACENAMIENTO

A 10-35 °C.

### PROCEDIMIENTO

#### Preparación de extendidos:

- Utilizar portaobjetos limpios y desengrasados.
- A partir del crecimiento microbiano en medios sólidos o líquidos: cuando la coloración de Gram se efectúa para caracterizar colonias, colocar en el portaobjeto una gota de solución fisiológica en la que se emulsionará la colonia que ha sido recolectada (mediante el uso de ansa o hisopo) del medio de cultivo en que se encuentra.

En caso de que se trate de medios líquidos, depositar una alícuota de cada uno de ellos en el portaobjetos.

- Directamente a partir de la muestra en estudio: es común que se preparen los extendidos directamente tomando la muestra (ejemplo pus, esputo, exudados, entre otros) con ansa, hisopo o pipeta estéril y diseminándola sobre la superficie del portaobjeto.

Según la muestra, puede prepararse una suspensión en aproximadamente 1 mL de solución fisiológica estéril dentro de un pequeño tubo estéril y luego tomar una alícuota y esparcirla en el portaobjeto.

#### Secado de extendidos:

- Colocar los portaobjetos en posición horizontal dentro de la estufa de cultivos o sobre la corriente de aire caliente de un mechero.

Fijado del extendido:

- A la llama: se efectúa pasando 3 veces el lado del portaobjeto que no tiene la preparación sobre la llama del mechero.
- Con alcohol metílico: cubrir el extendido durante 1 minuto. Este método permite obtener fijaciones mas uniformes sin destrucción de elementos por excesivo calentamiento y ahorro de tiempo.

Nota: en el caso de orinas es conveniente que luego que ha sido fijado el extendido se realice un lavado con chorro fino de

agua durante 10 segundos para arrastrar las sales que pudiera contener, dado que estas perjudican la correcta coloración. Luego colorear según técnica correspondiente.

Coloración: tiempo total: 2 minutos.

**Importante: en el caso de disponer de soluciones concentradas (10X) para Gram: Violeta de Genciana Concentrado para Gram, Lugol Concentrado para Gram y Safranina Concentrada para Gram, proceder como se detalla:**

Previo al uso efectuar la dilución 1/10 de la siguiente manera: por ejemplo tomar 10 mL de la solución concentrada y llevar a 100 mL con agua purificada.

Homogeneizar y distribuir en los envases apropiados.

**Técnica de Coloración:**

- Cubrir el extendido con Violeta para Gram. Dejar actuar 20 segundos.
- Lavar con agua corriente durante 10 segundos.
- Cubrir con Lugol. Dejar 30 segundos.
- Lavar con agua corriente durante 10 segundos.
- Cubrir con Decolorante para Gram. Decolorar durante 10 segundos.
- Lavar con agua corriente 10 segundos.
- Cubrir con Safranina para Gram. Dejar 20 segundos.
- Lavar con agua corriente durante 10 segundos.
- Secar el extendido.

**INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Cubrir el extendido con una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio óptico, con aumento 1000X.

Bacterias Gram positivas: se observan de color violáceo

Bacterias Gram negativas: se observan de color rosado-rojizo.

**CONTROL DE CALIDAD**

MICROORGANISMOS	GRAM
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Positivo
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Positivo
Escherichia coli ATCC 25922	Negativo

**LIMITACIONES**

- Casi todos los microorganismos pueden ser detectados por este método excepto las clamidias (parásitos intracelulares obligados), los micoplasmas y ureaplasmas (carecen de pared celular) y las espiroquetas (debido a su pequeño tamaño).
- Es evidente que la investigación precisa de un microorganismo sólo se realiza por pruebas bioquímicas y /o confirmación serológica, pero si la coloración de Gram no ha sido correctamente efectuada conducirá a seleccionar y realizar pruebas bioquímicas indebidas. Por eso, al realizar una coloración de Gram pueden cometerse errores por utilizar colorantes no certificados para bacteriología; concentración inadecuada de colorantes certifica-

dos; empleo de técnicas engorrosas; preparación de extendidos demasiado gruesos y no uniformes.

- Si se realiza la fijación por calor, no sobrecalentar el extendido por que podría llevar a resultados atípicos en la coloración posterior.

**MATERIALES NECESARIOS NO PROVISTOS**

Equipos y material de laboratorio, microorganismos para control de calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según requerimiento.

**PRECAUCIONES**

- Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclusivo.
- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.
- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- Utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto.
- Si el producto a utilizar es inflamable, mantenerlo lejos de fuentes de ignición.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.
- Las características del producto pueden alterarse si no se conserva apropiadamente.
- Descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes.

**REFERENCIAS**

- 1957. Manual of Microbiological Methods, Society of American Bacteriologists.
- Isenberg (ed.). 1992. Clinical microbiology procedures handbook, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

**INDICACIONES AL CONSUMIDOR**

Utilizar el producto hasta su fecha de vencimiento. Conservar el producto según las indicaciones del rótulo.

**AUTORIZACIÓN ANMAT**

Código B1446082  
PM -1292-43

Códigos B1446562, B14456852, B1446281, B1446321, B1445221, B1446421, B1446362, B1445262  
PM -1292-10

Dir. Técnico: Bioq. Alejandro Rossi

**SÍMBOLOS UTILIZADOS**

 DIAGNÓSTICO IN VITRO	 CÓDIGO N°	 LOTE N°	 ESTÉRIL
 ELABORADOR	 N° DE DETERMINACIONES	 INSTRUCCIONES DE USO	 FECHA DE VENCIMIENTO
			 LÍMITE DE TEMPERATURA