

KIT TINCIÓN GRAM

Colorantes para la Tinción de Gram

Colorantes y reactivos para llevar a cabo la coloración de microorganismos según la tinción de Gram.

CÓDIGOS:

Cristal Violeta	1L 5101	250 mL 5201
Solución Lugol	1L 5102	250 mL 5202
Decolorante de Gram	1L 5103	250 mL 5203
Fucsina de Gram	1L 5104	250 mL 5204
Safranina	1L 5105	250 mL 5205
Kit Tinción	1L 5116	250 mL 5216

FÓRMULA TEÓRICA:

Cristal Violeta

Cristal Violeta	20 gr
Oxalato amónico	8 gr
Etanol	200 ml
Agua destilada	800 ml

Solución Lugol

Yodo sublimado	3.3 gr
Yoduro potásico	6.6 gr
Agua destilada	1000 ml

Decolorante de Gram

Acetona	500 ml
Etanol	500 ml

Safranina

Safranina	2.5 gr
Etanol	100 ml
Agua destilada	900 ml

Fucsina de Gram

Fucsina básica	2.5gr
Etanol	50ml
Agua destilada	950ml

Descripción y usos:

Tinción clásica en Microbiología para identificación preliminar de microorganismos que permite además de subclasificarlos en Positivos o Negativos, hacer una buena observación de la morfología bacilar o cocoide de los mismos. Esta tinción se basa en la permeabilidad de la pared bacteriana al compuesto que forman el Cristal Violeta y el Lugol. Si la pared bacteriana es impermeable al compuesto, después de la decoloración y contratinción con Safranina, el microorganismo seguirá apareciendo de color violeta mientras que si la pared bacteriana resulta permeable, el compuesto se liberará completamente con la decoloración y gracias a la contratinción, las bacterias aparecerán de un color rosado-rojizo. Permite una muy buena visualización de la forma de la bacteria y la detección de cápsulas bacterianas. No presenta grandes problemáticas cuando utilizamos esta tinción para microorganismos directamente sobre muestras clínicas, siempre que éstas no acusen un exceso de contenido biliar, hemático, mucoso,... y carece de exceso de precipitaciones. No es recomendable su uso para microorganismos con patrones no homogéneos de tinción, como serían los casos de Actinomicetales, Micobacterias, Corynebacterias, Hongos y Levaduras, para los cuales se recomiendan variaciones de esta tinción o bien coloraciones específicas.

Utilización:

Existen multitud de variaciones de empleo por lo que hace al tiempo de inmersión en los distintos colorantes que componen la tinción. Se recomienda que las extensiones de microorganismos o muestra clínica se realicen en portaobjetos de cristal limpios y desengrasados debidamente identificados, se hayan dejado secar al aire y luego se hayan enfriado después de ser fijadas a la llama antes de aplicárseles los colorantes.

Inmersión del portaobjetos en Cristal Violeta 1 minuto

Aclarar completamente con agua

Inmersión del portaobjetos en Solución Lugol 1 minuto

Aclarar completamente con agua

Retirar el exceso de tinción con Decolorante sólo hasta retirar el exceso de colorante

Aclarar completamente con agua

Inmersión del portaobjetos en Safranina o Fucsina 1 minuto

Aclarar completamente con agua

Dejar secar al aire

Evitar usar papel de filtro para secar el exceso de agua en el último paso. La decoloración puede modificarse si sospechamos presencia de pneumococos. Para algunos microorganismos fastidiosos como *Legionella*, puede utilizarse una contratinción de Fucsina en solución acuosa en lugar de Safranina para aumentar el rendimiento en la observación microscópica. Hacer una primera inspección de los portaobjetos teñidos a pocos aumentos para pasar luego a una observación con aceite de inmersión a 100 x.

Almacenamiento:

Los reactivos para la tinción de Gram pueden conservarse a temperatura ambiente con las debidas precauciones para materiales inflamables que tenga instaurado el laboratorio. Deben evitarse exposiciones a la luz, para evitar fotooxidaciones del colorante. Se tienen que descartar los frascos que presenten precipitaciones. El frasco de Solución Lugol puede aparecer teñido de marrón debido a la alta permeabilidad de los vapores de Yodo al plástico, aunque esto no llega a afectar a la funcionalidad del mismo.

Control de Calidad:

Aplicar la tinción a portaobjetos debidamente fijados con los siguientes microorganismos:

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619	Observar morfología, tinción y cápsula.
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Observar morfología, tinción
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Observar morfología, tinción

Referencias:

Bartholomew, J.W. 1962. Variables influencing results and the precise definition of steps in Gram Staining as a means of Standardizing of the results. Stain Technol.; 37:139-155.