

## USO PROPUESTO

Para su uso en el método de coloración Gram para la diferenciación inicial de bacterias grampositivas y gramnegativas.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El colorante Gram fue originalmente creado por Christian Gram en 1884. El método estándar de Gram puede usarse para diferenciar bacterias morfológicamente similares intactas en dos grupos. Se centra en el color de la pared celular tras utilizar el método de coloración. Además la forma de la célula, el tamaño y los detalles estructurales son evidentes.

## PRINCIPIO

Se forma un compuesto de Crystal Violet-Iodine en el protoplasma de cualquier organismo colorado usando el proceso arriba indicado. Después de la descoloración, aquellos organismos que son capaces de retener este compuesto de color se clasifican como grampositivos. Aquellos organismos que están descoloridos y cogen el colorante de contraste se clasifican como gramnegativos.

Si se rompe o desaparece la pared celular, el protoplasma tanto de las células grampositivas como gramnegativas se puede descolorar, por lo tanto pierde el atributo gramnegativo. Así, el mecanismo de coloración Gram parece estar relacionado con la presencia de una pared celular intacta capaz de actuar como barrera para la descoloración del color primario. Generalmente, la pared celular no es selectivamente permeable. Está comprobado que durante el proceso de coloración Gram, la pared celular de las células grampositivas está deshidratada por el alcohol en el descolorizador y pierde permeabilidad, por lo tanto retiene la coloración primaria. En el caso de la pared celular de las células gramnegativas, debido al alto contenido en lípidos, la pared celular se convierte en más permeable cuando trata con alcohol, por lo tanto se pierde la coloración primaria, permitiendo así adoptar el último colorante de contraste.

## REACTIVOS

### Colorantes listos para su uso.

PL.7000	Violeta cristal	500 ml
PL.7001	Violeta cristal	1 litro
PL.7002	Violeta cristal	2 litros
PL.7000/25	Violeta cristal	250 ml
PL.7003	Yodo de Gram	500 ml
PL.7004	Yodo de Gram	1 litro
PL.7005	Yodo de Gram	2 litros
PL.7003/25	Yodo de Gram	250 ml
PL.7006	Diferenciador de Gram	500 ml
PL.7007	Diferenciador de Gram	1 litro
PL.7008	Diferenciador de Gram	2 litros
PL.7006/25	Diferenciador de Gram	250 ml
PL.7009	Rojo neutro	500 ml
PL.7010	Rojo neutro	1 litro
PL.7011	Rojo neutro	2 litros
PL.7009/25	Rojo neutro	250 ml
PL.7012	Safranina	500 ml
PL.7013	Safranina	1 litro
PL.7014	Safranina	2 litros
PL.7012/25	Safranina	250 ml
PL.7015	Carbol Fucsina diluida	500 ml
PL.7016	Carbol Fucsina diluida	1 litro
PL.7017	Carbol Fucsina diluida	2 litros

PL.7015/25	Carbol Fucsina diluida	250 ml
PL.7052	Yodo de Lugol	500 ml
PL.7053	Yodo de Lugol	1 litro
PL.7053-2	Yodo de Lugol	2 litros
PL.7056	Acetona Yodo	500 ml
PL.7057	Acetona Yodo	1 litro
PL.7058	Acetona Yodo	2 litros
PL.7101	Fucsina básica / rojo neutro	500 ml
PL.7102	Fucsina básica / rojo neutro	1 litro
PL.7103	Fucsina básica / rojo neutro	2 litros
PL.7073	C.Violeta – Oxalato de amonio	500 ml
PL.7074	C.Violeta – Oxalato de amonio	1 litro
PL.7075	C.Violeta – Oxalato de amonio	2 litros
PL.7110	Tinción de Sandifords	500 ml
PL.7111	Tinción de Sandifords	1 litro
PL.7112	Tinción de Sandifords	2 litros
PL.7113	Violeta de metilo	500 ml
PL.7114	Violeta de metilo	1 litro
PL.7115	Violeta de metilo	2 litros
PL.7116	Safranina / rojo neutro	500 ml
PL.7117	Safranina / rojo neutro	1 litro
PL.7118	Safranina / rojo neutro	2 litros
PL.7206	Diferenciador Gram (Acetona)	500 ml
PL.7207	Diferenciador Gram (Acetona)	1 litro
PL.7208	Diferenciador Gram (Acetona)	2 litros
PL.7306	Diferenciador Gram (IMS)	500 ml
PL.7307	Diferenciador Gram (IMS)	1 litro
PL.7308	Diferenciador Gram (IMS)	2 litros

### Colorantes concentrados. Diluya hasta 1 litro con agua destilada antes de su uso.

PL.8000	Violeta cristal	100 ml
PL.8001	Yodo de Gram	100 ml
PL.8002	Rojo neutro	100 ml
PL.8003	Safranina	100 ml
PL.8004	Carbol fucsina diluido	100 ml
PL.8010	Yodo de lugol	100 ml
PL.8011	Violeta metilo	100 ml

### Colorantes concentrados. Diluya hasta 4 litros con agua destilada antes de su uso.

PL.8000-4.0	Violeta cristal	400 ml
PL.8001-4.0	Yodo de Gram	400 ml
PL.8002-4.0	Rojo neutro	400 ml
PL.8003-4.0	Safranina	400 ml
PL.8004-4.0	Carbol fucsina diluido	400 ml
PL.8010-4.0	Yodo de lugol	400 ml
PL.8011-4.0	Violeta metilo	400 ml

### Colorantes concentrados. Diluya hasta 5 litros con agua destilada antes de su uso.

PL.8000-5.0	Violeta cristal	500 ml
PL.8001-5.0	Yodo de Gram	500 ml
PL.8002-5.0	Rojo neutro	500 ml
PL.8003-5.0	Safranina	500 ml
PL.8004-5.0	Carbol fucsina diluido	500 ml
PL.8010-5.0	Yodo de lugol	500 ml
PL.8011-5.0	Violeta de metilo	500 ml

## Kits de coloración (Listos para su uso)

PL.8055/25	Kit de coloración de Gram – Violeta cristal 250 ml, Yodo de Gram 250 ml, Diferenciador de Gram 250 ml, Safranina 250 ml.
PL.8056/25	Kit de coloración de Gram – Violeta cristal 250 ml, Yodo de Gram 250 ml, Diferenciador de Gram 250 ml, Rojo Neutro 250 ml.
PL.8057/25	Kit de coloración de Gram – Violeta Cristal 250 ml, Yodo de Gram 250 ml, Diferenciador de Gram 250 ml, Carbol fucsina diluido 250 ml.

## Aceite de inmersión (Peligro reducido –sin DBP)

PL.396	Aceite de inmersión	50 ml
--------	---------------------	-------

## PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Los colorantes Gram PRO-LAB Diagnostics se ofrecen sólo como un material *in vitro* y no debe utilizarse bajo ningún concepto para un propósito curativo o profiláctico.
- Durante su uso y después del mismo, manipule todos los materiales de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio, considerando siempre que todos los materiales del test deben ser manipulados como potencialmente biopeligrosos.
- El mecanismo no tiene más peligro medioambiental que el que tienen aquellas muestras clínicas que se usan con el mecanismo. Se deben tomar medidas de seguridad como si un organismo patógeno estuviera presente, cuando se manipulen, procesen y eliminen todas las muestras clínicas. Existe el impacto medioambiental y se aborda adecuadamente a través de una correcta eliminación.

## ESTABILIDAD Y CONSERVACIÓN

Temperatura ambiente. Fuera de fuentes de ignición. Fuera de la luz solar directa. Conservados en estas condiciones, los reactivos pueden ser usados hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto.

## RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA Y PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS.

Consulte un texto estándar de microbiología.

## MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS.

Portaobjetos de cristal limpios, asa esteril, llama / aire caliente, soporte de coloración, agua del grifo, aceite de inmersión, papel secante o sustituto equivalente.

## PROCEDIMIENTO.

- Prepare una extensión delgada y uniforme de la muestra y deje secar al aire.
- Fije al calor y deje enfriar.
- Inunde la preparación con Violeta de Cristal o Violeta de Metilo, deje reposar durante 1 minuto. Enjuague con agua.
- Inunde la preparación con tinción de Gram o yodo de Lugol, deje reposar durante 1 minuto. Enjuague con agua.
- Descolore suavemente con Diferenciador durante aprox. 10 segundos o Yodo Acetona durante 1 minuto. Enjuague con agua.
- Inunde la preparación con contratinción, deje reposar durante 30-60 segundos.
- Enjuague bien con agua, seque suavemente con papel secante.



- Mire utilizando microscopia de inmersión en aceite.

### CONTROL DE CALIDAD

La edad de los cultivos y el pH del medio en el que crecen las bacterias puede afectar notablemente su reacción a la coloración gram. Use cultivos recientes, de hasta 24 horas.

Cultivos de CC recomendados;

- *Escherichia coli* NCTC 10418 (Bacilos gramnegativos de Rosa a Rojo)
- *Staphylococcus aureus* de Oxford NCTC 6571 (Cocos grampositivos Azul a Malva)
- *Streptococcus hemolítico* grupo A NCTC 8198 (Cocos grampositivos Azul a Malva)

### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Organismos grampositivos – Azul a Malva.





Organismos gramnegativos – Rosa a Rojo.

### LIMITACIONES

- Se pueden ver resultados de coloración falsos grampositivos y gramnegativos si los restos celulares se coloran por medio de esta técnica. p. ej.,– El núcleo y protoplasma de las células sanguíneas blancas se coloran con el colorante de contraste. Pueden colorarse también partículas sólidas por el Violeta Cristal.
- Los colorantes Gram sólo aportan información de identificación preliminar y no son un sustituto del cultivo de la muestra.

### REFERENCIAS

- Manual of Clinical Microbiology Lennette.
- The Practice of Medical Microbiology. 12th Edition. V2. R. Cruickshank, J.P. Duguid, B.P. Marmion, R.H.A. Swain.

	= Fabricante
	= Dispositivo para diagnóstico médico In vitro
	= Limite de temperatura
	= Consultar las instrucciones de uso

**Las instrucciones de uso se tradujeron de manera profesional del inglés. En caso de ambigüedad o discrepancia evidente, por favor, dirijase al servicio de atención al cliente de Pro-Lab.**