

## APLICACIÓN

Los reactivos de tinción de Gram de Sigma-Aldrich se utilizan para la definición de organismos gram-positivos y gram-negativos en frotis y tejido. Los reactivos de tinción de Gram son para uso diagnóstico *in vitro*.

La tinción de Gram se utiliza clínicamente para definir dos grupos de microorganismos. Aquellos que retienen el colorante primario (violeta cristal) se conocen como gram-positivos, mientras que aquellos que pierden el colorante primario durante el paso de decoloración se conocen como gram-negativos. Se desconocen los mecanismos mediante los cuales los organismos gram-positivos retienen la tinción, aunque seguramente influyen la química y la estructura de las paredes de las células.

Se han descrito varias modificaciones del método de Gram original<sup>1</sup>. El procedimiento de Sigma-Aldrich se basa en el trabajo de Hucker y Conn<sup>2</sup> que utiliza una solución de violeta cristal-oxalato de amonio que ayuda en la diferenciación y que es bastante estable.

## REACTIVOS

**SOLUCIÓN DE VIOLETA CRISTAL**, número de catálogo HT90-1

Violeta cristal certificada, 2,3 %, oxalato de amonio, 0,1 %, y alcohol etílico al 20 %, SD3A.

**SOLUCIÓN DE YODO DE GRAM**, número de catálogo HT90-2

Yodo, 0,33 % y yoduro de potasio, 0,66 %.

**SOLUCIÓN DECOLORANTE**, número de catálogo HT90-3

**Sólo para frotis.**

Alcohol isopropílico, 75 %, y acetona, 25 %.

**SOLUCIÓN DE SAFRANINA O**, número de catálogo HT90-4

Safranina certificada 0,6 % en alcohol etílico al 20 %, SD3A.

**SOLUCIÓN DE TARTRAZINA**, número de catálogo HT30-2-8

**Sólo para tejidos.**

Tartrazina, 0,25 %, y ácido acético, 0,25 %.

**ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:**

Almacenar a temperatura ambiente (18–26 °C). La etiqueta del reactivo indica la fecha de caducidad. Utilizar una sola vez y desechar.

**PREPARACIÓN:**

Todos los reactivos están listos para su uso.

**PRECAUCIONES:**

Se deben seguir las precauciones normales ejercidas en el manejo de reactivos de laboratorio. Deshacerse de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales. Consultar la Hoja de datos de seguridad del material para obtener cualquier información actualizada sobre riesgos, peligros o seguridad.

Los portaobjetos de control TISSUE-TROL para tinción de Gram son tejido animal embebido en parafina, que contienen bacterias gramnegativas y grampositivas y deben considerarse potencialmente infecciosos.

Declaración de riesgos y seguridad (EE.UU.)

La solución de violeta cristal es **COMBUSTIBLE** e **IRRITANTE**. Irritante para el sistema respiratorio y la piel. Riesgo de daño grave para los ojos. Evidencia escasa de efectos carcinógenos. Perjudicial para los organismos acuáticos, puede causar efectos adversos a largo plazo en el medio acuático. Mantener alejada de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. Evitar su liberación en el medio ambiente. Consultar las hojas de instrucciones y de datos de seguridad.

Solución de yodo de Gram. Precaución: Sustancia en proceso de prueba.

La solución decolorante es **INFLAMABLE** e **IRRITANTE**. Altamente inflamable. Irritante para el sistema respiratorio y la piel. Riesgo de daño grave para los ojos. Mantener alejada de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada. Mantener el envase bien cerrado y en un lugar bien ventilado.

La solución de safranina O es **INFLAMABLE** y **PERJUDICIAL**. Perjudicial por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Perjudicial: posible riesgo de efectos irreversibles por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Mantener alejada de las llamas – no fumar. Usar ropa y guantes protectores adecuados. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

El alcohol reactivo es **INFLAMABLE** e **IRRITANTE**. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Mantener el envase bien cerrado. Mantener alejado de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada. Órganos a los que afecta: nervios e hígado.

El xileno es **INFLAMABLE** y **PERJUDICIAL**. Posible riesgo de infertilidad. Puede causar daños al feto. Perjudicial por inhalación y por contacto con la piel. Irritante para el sistema respiratorio y la piel. Riesgo de daño grave para los ojos. Mantener alejado de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

La acetona es **INFLAMABLE** e **IRRITANTE**. Irritante para los ojos. Una exposición reiterada puede causar sequedad o grietas en la piel. Los vapores pueden causar somnolencia o mareo. Mantener el envase en un lugar bien ventilado. Mantener alejada de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Órganos a los que afecta: hígado y riñones.

Declaración de riesgos y seguridad (U.E.) (Precaución: sustancias en proceso de prueba)

La solución de violeta cristal es **PERJUDICIAL**. Inflamable. Evidencia escasa de efectos carcinógenos. Perjudicial para los organismos acuáticos, puede causar efectos adversos a largo plazo en el medio acuático. Mantener alejada de las llamas – no fumar. Usar ropa y guantes protectores adecuados. Evitar su liberación en el medio ambiente. Consultar las hojas de instrucciones y de datos de seguridad.

Solución de yodo de Gram. Precaución: Sustancia en proceso de prueba.

La solución decolorante es **INFLAMABLE** e **IRRITANTE**. Altamente inflamable. Irritante para el sistema respiratorio y la piel. Riesgo de daño grave para los ojos. Mantener alejada de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada.

La solución de safranina O es **INFLAMABLE**. Mantener alejada de las llamas – no fumar.

El alcohol reactivo es **ALTAMENTE INFLAMABLE** e **IRRITANTE**. Altamente inflamable. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Mantener el envase bien cerrado. Mantener alejado de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada.

El xileno es **PERJUDICIAL**. Inflamable. Perjudicial por inhalación y por contacto con la piel. Irritante para la piel. Evitar el contacto con los ojos.

La acetona es **ALTAMENTE INFLAMABLE** e **IRRITANTE**. Altamente inflamable. Irritante para los ojos. Una exposición reiterada puede causar sequedad o grietas en la piel. Los vapores pueden causar somnolencia o mareo. Mantener el envase en un lugar bien ventilado. Mantener alejada de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica.

## PROCEDIMIENTO

**RECOGIDA DE LA MUESTRA:**

Se recomienda que la recogida de la muestra se lleve a cabo de acuerdo con las directrices del documento M29-A2 de la NCCLS. Ningún método de prueba puede garantizar la completa seguridad de que las muestras de sangre o tejido no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre o muestras de tejido deben considerarse potencialmente infecciosos.

**Frotis:** Cualquier frotis bien preparado y fijado por calor es aceptable. El grosor del frotis influirá en el tiempo necesario para la decoloración.

**Tejido:** Cualquier corte con un grosor de 5 micras, bien fijado con parafina.

**MATERIAL ESPECIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:**

En cada proceso se deben incluir portaobjetos de control positivo

ALCOHOL, ABSOLUTO

ACETONA, GRADO ACS

XILENO

Microscopio

**NOTAS:**

Debe evitarse la decoloración excesiva de los portaobjetos con la solución decolorante. Incluso los organismos gram-positivos pueden decolorarse y volverse rojos si se deja la solución decolorante encima del portaobjetos durante períodos de tiempo excesivamente largos<sup>4</sup>.

Los datos obtenidos mediante este procedimiento sólo sirven como ayuda en el diagnóstico y deben ser revisados junto con otras pruebas clínicas o información de diagnóstico.

**PROCEDIMIENTO PARA FROTIS:**

1. Cubrir el frotis con solución de violeta cristal, número de catálogo HT90-1, durante **1 minuto**.
2. Aclarar bien con agua desionizada.
3. Cubrir el frotis con solución de yodo de Gram, número de catálogo HT90-2, durante **1 minuto**.
4. Aclarar bien con agua desionizada.
5. Cubrir el frotis con solución decolorante, número de catálogo HT90-3, durante **10 segundos** hasta que ya no pierda color.
6. Aclarar bien con agua desionizada.
7. Cubrir el frotis con solución de safranina O, número de catálogo HT90-4, durante **1 minuto**.
8. Aclarar bien con agua desionizada.
9. Secar el frotis al aire y examinar con el microscopio.

**PROCEDIMIENTO PARA TEJIDOS:**

1. Desparafinar e hidratar los cortes llevándolos hasta agua desionizada.
2. Colocar los portaobjetos en la gradilla de tinción y cubrir los cortes con solución de violeta cristal, número de catálogo HT90-1, durante **1 minuto**.
3. Evacuar la solución de violeta cristal y aclarar bien con agua desionizada.
4. Mordiente en solución de yodo de Gram, número de catálogo HT90-2, durante **5 minutos**.
5. Aclarar con agua desionizada y secar los cortes mediante absorción.
6. Diferenciar en alcohol absoluto o acetona.
7. Aclarar con agua desionizada.
8. Cubrir los portaobjetos con solución de safranina O, número de catálogo HT90-4, durante **30–60 segundos**.

9. Aclarar con agua desionizada y secar los cortes mediante absorción.
10. Cubrir los cortes con solución de tartrazina, número de catálogo HT30-2, durante **5-10 segundos**.
11. Secar mediante absorción el exceso de tinción.
12. Aclarar con alcohol absoluto, cambiándolo 2 veces.
13. Aclarar con xileno y montar.

---

## CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

---

Organismos gram-positivos — Púrpura  
Organismos gram-negativos — Rojo

Si los resultados observados varían de los esperados, póngase en contacto con el Servicio Técnico de Sigma-Aldrich.

---

## REFERENCIAS

---

1. Gram C: Ueber die isolierte färbung der schizomyceten in schnitt und trockenpräparaten. Fortschr Med 2:185, 1884
2. Hucker GJ, Conn HJ: Further studies on the methods of Gram staining. NY Agric Exp Stn Tech Bull No. 128, 1927
3. Histopathological Technic and Practical Histochemistry, 3rd ed., RD Lillie, Editor. McGraw-Hill, New York, 1965, pp 565-567
4. Theory and Practice of Histotechnology, 2nd Edition, Sheehan DC and Hrapchak BB, Battelle Press, Columbus (OH), 1980 p 234

Sigma-Aldrich, Inc. garantiza que sus productos concuerdan con la información contenida en ésta y otras publicaciones de Sigma-Aldrich. El comprador debe determinar la idoneidad de los productos para su uso particular. Es posible que deban aplicarse términos y condiciones adicionales. En el reverso de la factura o del albarán se incluyen los términos adicionales y las condiciones de venta.

Procedimiento número HT90  
Revisión anterior: 2003-09  
Revisión: 2005-01



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse  
Egham TW20 9BD Reino Unido

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 EE.UU. +1 314 771 5765

Servicio Técnico: a cobro revertido al +1 314 771 3122

o por correo electrónico a [clintech@sial.com](mailto:clintech@sial.com)

Para realizar pedidos: a cobro revertido al +1 314 771 5750

[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

P.O. 1120, 89552 Steinheim, Alemania 49-7329-970